



Catarina Luísa da Silva  
Lopes e Campos de  
Oliveira

**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE  
GANGLIÓSIDOS EM CÉREBRO DE MODELOS  
ANIMAIS DE DOENÇA DE ALZHEIMER: UM ESTUDO  
LIPIDÓMICO.**

**IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF  
GANGLIOSIDES IN BRAIN OF MOUSE MODELS OF  
ALZHEIMER'S DISEASE: A LIPIDOMIC STUDY.**





Catarina Luísa da Silva  
Lopes e Campos de  
Oliveira

**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE  
GANGLIÓSIDOS EM CÉREBRO DE MODELOS  
ANIMAIS DE DOENÇA DE ALZHEIMER: UM ESTUDO  
LIPIDÓMICO.**

**IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF  
GANGLIOSIDES IN BRAIN OF MOUSE MODELS OF  
ALZHEIMER'S DISEASE: A LIPIDOMIC STUDY.**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, ramo de Métodos Biomoleculares, realizada sob a orientação científica do Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues, Professor Auxiliar com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Maria do Rosário Gonçalves Reis Marques Domingues, Professora Associada com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Apoio financeiro da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT, Portugal), da União Europeia, QREN, no âmbito do Programa Operacional Temático Fatores de Competitividade (COMPETE), à Unidade de Investigação QOPNA (projeto PEst-C/QUI/UI0062/2013; FCOMP-01-0124-FEDER-037296).





*Aos meus Avós, Alice, Maria, Luís e Alberto.*

*À saudade: Daniela Ferreira.*



## **O Júri**

Presidente

**Doutora Rita Maria Pinho Ferreira**

Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues**

Professor Auxiliar com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Doutora Rosa Maria Branco de Matos Costa Resende**

Bolseira de Pós-Doutoramento do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra





## **Agradecimentos**

Para começar, agradeço a Aveiro e a tudo o que de bom acompanha esta palavra, por estes 5 incríveis anos.

Aos meus orientadores Doutor Pedro Domingues e Doutora Rosário Domingues pela constante disponibilidade, por me ensinarem tudo o que sabem e pela incansável ajuda na realização deste trabalho. Um muito obrigado!

Ao grupo de Espectrometria de Massa pelo incrível ambiente, boa disposição e entreaajuda. Um agradecimento especial à Tânia Melo pela paciência, pela pronta disponibilidade, pelo apoio constante e por todos os “Precisas de ajuda?” no momento certo.

Obrigado a todos os meus amigos de Aveiro, por tornarem esta cidade a minha segunda casa e por se tornarem a minha segunda família. Aos mosqueteiros Marta Dâmaso, Liliana Silva, Daniel Tavares e Rafael Carmo, simplesmente não podia ter maior sorte em encontrar 4 pessoas que partilhem o mesmo nível de sanidade que eu! Aos restantes guerreiros Liliana Pereira, Sara Oliveira, Raquel Saborano, Sofia Brandão, Sofia Duarte, Sónia Fernandes, Mariana Mamede, Marta Joana e Pedro Campos, por me fazerem levar a amizade a sério. À minha equipa do Núcleo de Estudantes de Química pelo ano de crescimento e de amizade. Muito obrigado!

Por último, um muito obrigado à minha família. Aos meus avós, por entenderem as minhas ausências. Aos meus maiores patrocinadores: o meu pai, por me dar o prazer de ser “a menina do papá”; à minha mãe, pelo apoio incondicional e amor partilhado. Ao meu irmão, por me obrigar a ser melhor para que possa ser um exemplo, por todas as vezes que me pediu ajuda, por ser o amigo que não pedi.

Sozinha não seria possível. Do fundo do coração, agradeço a todos o que acompanharam neste meu caminho.



**Palavras-chave**

Gangliósidos, fosfolípidos, ratinho 3xTG-AD, doença de Alzheimer, espectrometria de massa, lipidómica.

**Resumo**

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa, sendo a forma mais comum de demência. As projeções para 2030 apontam para 75,6 milhões de casos, e o triplo para 2050. A doença de Alzheimer é caracterizada pela presença de deposição do péptido  $\beta$ -amilóide e tranças neurofibrilares. Durante o processo neurodegenerativo, as propriedades físico-químicas das membranas são alteradas. Esta alteração pode resultar de uma desregulação nas proporções dos fosfolípidos e gangliósidos e/ou de mudanças nos rácios. Assim, o objetivo principal deste trabalho foi identificar alterações no perfil de fosfolípidos e de gangliósidos em cérebro de modelo de ratinho triplo transgénico 3xTG-AD de forma a melhor compreender a patologia da doença de Alzheimer e identificar possíveis biomarcadores. Através da uma abordagem lipidómica usando HILIC-LS-MS determinou-se o efeito das 3 mutações presentes no modelo experimental, associadas à doença de Alzheimer, no perfil dos lípidos extraídos da fase aquosa e da fase orgânica do cérebro. Sucintamente, verificou-se um aumento da abundância relativa das classes de fosfolípidos PE, LPE, PEp, PG, PS e de sulfatidos, e uma diminuição da classe de PI, relativamente ao grupo controlo. Na análise dos gangliósidos, na fase aquosa, observou-se uma diminuição dos gangliósidos com apenas um ácido siálico, GM1 e GM2, e o aumento dos gangliósidos mais complexos, GT1, 9-*O*-acetil GT1b e GQ1. Estes resultados permitem-nos discriminar as amostras de acordo com o grupo a que pertencem, estando as variações de abundância relativa dos lípidos intimamente relacionadas com a doença. Em conclusão, o nosso trabalho permitiu detetar alterações na homeostasia dos gangliósidos e fosfolípidos na doença de Alzheimer, enfatizando a sua importância em condições fisiológicas. Este trabalho fornece uma nova visão de como, na sua globalidade, os fosfolípidos e os gangliósidos podem ser utilizados como possíveis marcadores da doença de Alzheimer.



**Keywords**

Ganglioside, phospholipids, 3xTG-AD mouse, Alzheimer's disease, mass spectrometry, lipidomics.

**Abstract**

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disease and the most common form of dementia. Projections for 2030 point to 75.6 million cases, and almost triple by 2050. Alzheimer's disease is characterized by the deposition of  $\beta$ -amyloid peptide and neurofibrillary tangles. During the neurodegenerative process, the physicochemical properties of the membranes are changed, affecting cell function. This change can result from a disruption in the proportions of phospholipids and ganglioside and/or changes in ratios and may contribute to this condition. Thus, the main objective of this work is to identify changes in the phospholipid profile and ganglioside in triple-transgenic model (3xTG-AD) in order to better understand the pathology of Alzheimer's disease and identify potential biomarkers. Through a lipidomic approach it was determined the effect of the 3 mutations present in the experimental model associated with Alzheimer's disease, in lipid profile extracted from the aqueous phase and the organic phase of the brain. Briefly, there was an increase in relative abundance of the phospholipid classes PE, LPE, PEp, PG, PS and sulfatides, and a decrease of PI class, relative to the control group. In the analysis of gangliosides was observed a decrease in ganglioside with only one sialic acid, GM1 and GM2, and increased of more complex gangliosides, GT1, 9-*O*-acetyl GT1b and GQ1. These results allow us to discriminate the samples according to the group they belong, with changes in relative abundance of lipids intimately associated with the disease. In conclusion, our study allowed us to detect changes in the homeostasis of gangliosides and phospholipids in Alzheimer's disease, highlighting its importance in physiological conditions. This study provides a new view as a whole, that phospholipids and ganglioside can be used as possible markers of Alzheimer's disease.



# Índice

<b>Índice de tabelas .....</b>	<b>III</b>
<b>Índice de figuras .....</b>	<b>V</b>
<b>Abreviaturas .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Capítulo 1 – Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1. Doença de Alzheimer.....	3
1.2. Lípidos de membrana envolvidos na doença de Alzheimer .....	6
1.2.1. Perfil dos gangliósidos envolvidos na doença de Alzheimer .....	7
1.2.2. Perfil dos fosfolípidos envolvidos na doença de Alzheimer .....	15
1.3. Abordagem lipidómica no estudo de gangliósidos e fosfolípidos .....	20
1.4. Objetivo .....	24
<b>Capítulo 2 – Materiais e Métodos .....</b>	<b>25</b>
2.1. Reagentes .....	27
2.2. Animais e protocolo experimental .....	27
2.3. Preparação da amostra.....	28
2.4. Quantificação da proteína total .....	28
2.5. Extração de gangliósidos de homogeneizado de cérebro.....	28
2.6. Quantificação dos fosfolípidos da fase orgânica.....	29
2.7. Cromatografia líquida de alta performance acoplada a espetrometria de massa (HPLC-MS).....	30
2.8. Análise estatística.....	32
<b>Capítulo 3 – Resultados.....</b>	<b>33</b>
3.1. Alteração do perfil de gangliósidos no cérebro de ratinhos transgénicos com doença de Alzheimer por HPLC-MS .....	35

3.2. Alteração do perfil de fosfolípidos da fase orgânica do cérebro de ratinhos transgênicos com doença de Alzheimer por HPLC-MS .....	49
<b>Capítulo 4 – Discussão de resultados .....</b>	<b>63</b>
<b>Capítulo 5 - Conclusão e trabalhos futuros.....</b>	<b>75</b>
<b>Capítulo 6 – Referências .....</b>	<b>79</b>



## Índice de tabelas

<b>Tabela 1</b> – Composição de gangliósidos no extratino de uma mistura de gangliósidos de cérebro de ratinho controlo (n=5) e ratinho transgénico para a doença de Alzheimer (n=4), detetado em modo negativo por HILIC-ESI-MS. Identidade determinada por medida de massa exata. ....	36
<b>Tabela 2</b> – Principais iões produto observados no espectro de ESI-MS/MS do ião $[GM1-H]^-$ , com a indicação da fórmula prevista, massa teórica e experimental e erro de massa medida. ....	39
<b>Tabela 3</b> – Principais iões produto observados no espectro de ESI-MS/MS do ião $[GD3-2H]^{2-}$ , com a indicação da fórmula prevista, massa teórica e experimental e erro de massa medida. ....	40
<b>Tabela 4</b> - Principais iões produto observados no espectro de ESI-MS/MS do ião $[GT1-2H]^{2-}$ , com a indicação da fórmula prevista, massa teórica e experimental e erro de massa medida. ....	41
<b>Tabela 5</b> - Principais iões produto observados no espectro de ESI-MS/MS do ião $[9O-Acetil-GT1b-2H]^{2-}$ , com a indicação da fórmula prevista, massa teórica e experimental e erro de massa medida. ....	42
<b>Tabela 6</b> - Composição de gangliósidos extraídos de cérebro de ratinho controlo e transgénico para a doença de Alzheimer. ....	43
<b>Tabela 7</b> – Teste multivariado de comparação da composição de gangliósidos no grupo controlo e transgénico ....	45
<b>Tabela 8</b> - Funções dos valores centróides discriminantes para valores médios dos grupos experimentais ....	47
<b>Tabela 9</b> – Testes estatísticos de funções ....	47
<b>Tabela 10</b> - Teste multivariado de comparação da composição de fosfolípidos no grupo controlo e transgénico ....	49
<b>Tabela 11</b> - Identificação dos $[M+CH_3COO]^-$ observados no espectro de MS das PC. Os fosfolípidos são designados como: diacil 34:1 PC, onde 34 indica o número total de átomos de carbono nas posições <i>sn</i> -1 e <i>sn</i> -2 e 1 indica o número de ligações duplas nas duas posições. ....	51
<b>Tabela 12</b> - Identificação dos iões $[M-H]^-$ observados no espectro de MS das PE. Os fosfolípidos são designados como: diacil 34:1 PE, onde 34 indica o número total de átomos de carbono nas posições <i>sn</i> -1 e <i>sn</i> -2 e 1 indica o número de ligações duplas nas duas posições. ....	53
<b>Tabela 13</b> - Identificação dos iões $[M-H]^-$ observados no espectro de MS das PG. Os fosfolípidos são designados como: diacil 34:1 PG, onde 34 indica o número total de átomos de carbono nas posições ....	55
<b>Tabela 14</b> - Identificação dos iões $[M-H]^-$ observados no espectro de MS das PI. Os fosfolípidos são designados como: diacil 34:1 PI, onde 34 indica o número total de átomos de carbono nas posições <i>sn</i> -1 e <i>sn</i> -2 e 1 indica o número de ligações duplas nas duas posições. ....	57

<b>Tabela 15</b> - Identificação dos iões $[M-H]^-$ observados no espectro de MS das PS. Os fosfolípidos são designados como: diacil 34:1 PS, onde 34 indica o número total de átomos de carbono nas posições <i>sn</i> -1 e <i>sn</i> -2 e 1 indica o número de ligações duplas nas duas posições. ....	58
<b>Tabela 16</b> - Identificação dos iões $[M-H]^-$ observados no espectro de MS dos sulfatido.....	60
<b>Tabela 17</b> - Funções dos valores centróides discriminantes para valores médios dos grupos experimentais .....	60
<b>Tabela 18</b> - Testes estatísticos de funções.....	61

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> - Estrutura do gangliósido GM1. ....	8
<b>Figura 2</b> – Vias de biossíntese dos gangliósidos (adaptado de 20). Os nomes dos gangliósidos estão de acordo com Svennerholm <sup>50</sup> . Cer- ceramida; Glc- glucose; Gal- galactose; GalNAc- <i>N</i> -acetilgalactosamina; NeuAc- ácido acetilneuramínico; GlcCer- glucosilceramida; LacCer- lactosilceramida.....	11
<b>Figura 3</b> - Agregação do péptido A $\beta$ através de interações com os gangliósidos presentes na membrana neuronal (adaptado de 65). ....	12
<b>Figura 4</b> – Diferentes tipos de fosfolípidos, na posição <i>sn</i> -1 possível ligação acil, éter vinil e éter; <i>sn</i> -2 ácido gordo e grupo polar em <i>sn</i> -3 do glicerol (adaptado de 87). ....	15
<b>Figura 5</b> – Fluxograma de trabalho típico para análise lipidómica por espectrometria de massa (adaptado de 149). TLC – Cromatografia em camada fina; GC – Cromatografia gasosa; HPLC - Cromatografia líquida de alta performance; LC – Cromatografia líquida; ESI - Ionização por <i>electrospray</i> ; EI - Impacto eletrónico; MALDI - Ionização por adsorção por laser associada a matriz. ....	23
<b>Figura 6</b> – Espectro de HPLC-MS do extratino aquoso de cérebro de ratinho obtido em modo negativo, entre <i>m/z</i> 600-1600, de cérebro controlo (A) e transgénico com doença de Alzheimer (B). ....	35
<b>Figura 7</b> - Espectro de MS/MS do ião [M-H] <sup>-</sup> GM1 d18:1/18:0, <i>m/z</i> 1544,8722 e as suas vias de fragmentação.....	39
<b>Figura 8</b> - Espectro de MS/MS do ião [M-2H] <sup>2-</sup> GD3 d18:1/18:0, <i>m/z</i> 734,9130 e as suas vias de fragmentação.....	40
<b>Figura 9</b> - Espectro de MS/MS do ião [M-2H] <sup>2-</sup> GT1 d18:1/16:0, <i>m/z</i> 1071,0300 e as suas vias de fragmentação.....	41
<b>Figura 10</b> - Espectro de MS/MS do ião [M-2H] <sup>2-</sup> 9-O-acetil GT1b d18:1/18:0, <i>m/z</i> 1084,0331 e as suas vias de fragmentação.....	42
<b>Figura 11</b> - Conteúdo de gangliósidos, estatisticamente significativas, no extratino de cérebro de ratinho controlo e transgénico analisado por HPLC-MS em modo negativo. Diferenças significativas do controlo: * <i>p</i> < 0,05, ** <i>p</i> < 0,01 e *** <i>p</i> < 0,001.....	43
<b>Figura 12</b> - Diferença entre a média das áreas dos gangliósidos da família GT1. Média das áreas dos iões da família GT1 presentes no extratino aquoso do cérebro de ratinho controlo (a branco) e de ratinho transgénico (a preto). * <i>p</i> < 0,05, ** <i>p</i> < 0,01, *** <i>p</i> < 0,001 controlo versus transgénico. .	46
<b>Figura 13</b> - Diferença entre a média das áreas dos gangliósidos da família GT1b <i>O</i> -acetilados. Média das áreas dos iões da família GT1b <i>O</i> -acetilados presentes no extratino aquoso do cérebro de ratinho	

controlo (a branco) e de ratinho transgénico (a preto). * $p < 0,05$ , ** $p < 0,01$ , *** $p < 0,001$ controlo versus transgénico. ....	46
<b>Figura 14</b> – Diagramas de caixa de bigodes que ilustra a distribuição de valores para os dois grupos controlo (n=5) e transgénico (n=4), de acordo com o conteúdo de gangliósidos.....	48
<b>Figura 15</b> – Espectro de HPLC-MS, adquirido a rt 11 a 14 minutos, demonstrando a presença dos iões $[M+CH_3COO]^-$ da classe PC (estrutura representada na figura), em modo negativo do extratino lipídico do cérebro controlo. O espectro encontra-se representado em termos de abundância relativa de cada ião em função do seu valor $m/z$ . ....	50
<b>Figura 16</b> - Espectro de HPLC-MS, adquirido a rt = 3-4 minutos, demonstrando a presença dos iões $[M-H]^-$ da classe PE (estrutura representada na figura), em modo negativo do extratino lipídico do cérebro controlo. O espectro encontra-se representado em termos de abundância relativa de cada ião em função do seu valor $m/z$ . ....	52
<b>Figura 17</b> – Conteúdo de espécies moleculares de PE, estatisticamente significativas, no extratino de cérebro de ratinho controlo e transgénico analisado por HPLC-MS em modo negativo. A identificação das espécies moleculares indicam o seu conteúdo C:N (número de carbono: número de insaturações). Diferenças significativas do controlo: * $p < 0,05$ , ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ . ....	52
<b>Figura 18</b> - Espectro de HPLC-MS, adquirido a rt = 2-3 minutos, demonstrando a presença dos iões $[M-H]^-$ da classe PG (estrutura representada na figura), em modo negativo do extratino lipídico do cérebro controlo. O espectro encontra-se representado em termos de abundância relativa de cada ião em função do seu valor $m/z$ . ....	54
<b>Figura 19</b> - Conteúdo de espécies moleculares de PG, estatisticamente significativas, no extratino de cérebro de ratinho controlo e transgénico analisado por HPLC-MS em modo negativo. A identificação das espécies moleculares indicam o seu conteúdo C:N (número de carbono: número de insaturações). Diferenças significativas do controlo: * $p < 0,05$ , ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ . ....	55
<b>Figura 20</b> - Espectro de HPLC-MS, adquirido a rt = 2-3 minutos demonstrando a presença dos iões $[M-H]^-$ da classe PI (estrutura representada na figura), em modo negativo do extratino lipídico do cérebro controlo. O espectro encontra-se representado em termos de abundância relativa de cada ião em função do seu valor $m/z$ . ....	56
<b>Figura 21</b> - Conteúdo de espécies moleculares de PI, estatisticamente significativas, no extratino de cérebro de ratinho controlo e transgénico analisado por HPLC-MS em modo negativo. A identificação das espécies moleculares indicam o seu conteúdo C:N (número de carbono: número de insaturações). Diferenças significativas do controlo: * $p < 0,05$ , ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ . ....	56
<b>Figura 22</b> - Espectro de HPLC-MS, adquirido a rt 6-7 minutos, demonstrando a presença dos iões $[M-H]^-$ da classe PS (estrutura representada na figura), em modo negativo do extratino lipídico do	

cérebro controlo. O espectro encontra-se representado em termos de abundância relativa de cada ião em função do seu valor $m/z$ .....	57
<b>Figura 23</b> - Conteúdo de espécies moleculares de PS, estatisticamente significativas, no extratino de cérebro de ratinho controlo e transgénico analisado por HPLC-MS em modo negativo. A identificação das espécies moleculares indicam o seu conteúdo C:N (número de carbono: número de insaturações). Diferenças significativas do controlo: * $p < 0,05$ , ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ . ....	58
<b>Figura 24</b> – Estrutura molecular generalizada do sulfatido.....	59
<b>Figura 25</b> - Conteúdo de espécies moleculares de sulfatido, estatisticamente significativas, no extratino de cérebro de ratinho controlo e transgénico analisado por HPLC-MS em modo negativo. A identificação das espécies moleculares indica o número de carbonos e insaturações da esfingosina e do ácido gordo. Diferenças significativas do controlo: * $p < 0,05$ , ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ .....	59
<b>Figura 26</b> - Diagramas de caixa de bigodes que ilustra a distribuição de valores para os dois grupos controlo (n=5) e transgénico (n=5), de acordo com o conteúdo de fosfolípidos.....	62

## Abreviaturas

<b>ANOVA</b>	Análise de variância com um fator
<b>ApoE</b>	Apolipoproteína E
<b>APP</b>	Proteína precursora da beta amilóide
<b>A<math>\beta</math></b>	Péptido beta amilóide
<b>A<math>\beta</math><sub>40</sub></b>	Péptidos beta amilóide com 40 aminoácidos
<b>A<math>\beta</math><sub>42</sub></b>	Péptidos beta amilóide com 42 aminoácidos
<b>Cer</b>	Ceramida
<b>EI</b>	Impacto eletrônico
<b>ESI</b>	Ionização por <i>electrospray</i>
<b>Gal</b>	Galactose
<b>GalCer</b>	Galactosilceramida
<b>GalNAc</b>	D- <i>N</i> -acetilgalactosamina
<b>GalNAcT</b>	$\beta$ 1,4- <i>N</i> -acetil-galactosaminiltransferase I
<b>GalT-II</b>	$\beta$ 1,3-galactosiltransferase IV
<b>GC</b>	Cromatografia gasosa
<b>GEMs</b>	Microdomínios enriquecidos em glicosfingolípidos
<b>Glc</b>	Glucose
<b>GlcCer</b>	Glucosilceramida
<b>GlcCer sintase</b>	<i>N</i> -acilesfingosina $\beta$ -D-glicosiltransferase
<b>GlcNAc</b>	D- <i>N</i> -acetilglucosamina
<b>GM2/ GD2 sintase</b>	$\beta$ 1,4- <i>N</i> -acetil-galactosamina transferase I
<b>GSL</b>	Glicosfingolípidos
<b>GT</b>	Glicosiltransferase
<b>HESI-II</b>	Fonte de <i>electrospray</i> aquecida
<b>HILIC</b>	Cromatografia líquida de interação hidrofílica
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta performance
<b>LacCer</b>	Lactosilceramida
<b>LacCer sintase</b>	GlcCer $\beta$ 1,4-galactosiltransferase
<b>LC</b>	Cromatografia líquida
<b>LPC</b>	Lisofosfatidilcolina
<b>LPE</b>	Lisofosfatidiletanolamina
<b>LTQ- Orbitrap</b>	Espectrómetro de massa do tipo trapa linear acoplada a orbitrap
<b>MAG</b>	Glicoproteínas associadas à mielina
<b>MALDI</b>	Ionização por adsorção por laser associada a matriz
<b>MANOVA</b>	Análise de variância multivariada
<b>MCI</b>	Défice cognitivo ligeiro
<b>MS</b>	Espetrometria de massa

<b>MS/MS</b>	Espetrometria de massa em tandem
<b>NeuAc</b>	Ácido acetilneuramínico
<b>NFT</b>	Tranças neurofibrilares
<b>PA</b>	Ácido fosfatídico
<b>PC</b>	Fosfatidilcolina
<b>PE</b>	Fosfatidiletanolamina
<b>PEp</b>	Plasmalogéneo fosfatidiletanolamina
<b>PHF</b>	Filamentos helicoidais emparelhados
<b>PI</b>	fosfatidilinositol
<b>PS</b>	Fosfatidilserina
<b>PSEN</b>	Presenilina
<b>Q-Trap</b>	Espectrómetro de massa do tipo quadrupólo linear híbrido com trapa de iões
<b>SPE</b>	Extração em fase sólida
<b>TLC</b>	Cromatografia em camada fina
<b>UDP</b>	Uridina difosfato





## **Capítulo 1 – Introdução**



### 1.1. Doença de Alzheimer

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, demência é uma síndrome – crônica ou de natureza progressiva - onde existe deterioração da função cognitiva, como memória, concentração e pensamento<sup>1</sup>. Apesar de afetar, maioritariamente, pessoas de idade avançada, não faz parte do processo normal de envelhecimento. A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa, sendo a forma mais comum de demência, contribuindo para cerca de 60 a 70 % dos casos, a nível mundial. As projeções para 2030 apontam para 75,6 milhões de casos, e o triplo para 2050.

A doença de Alzheimer pode ser classificada de acordo com a idade de aparecimento dos sintomas como doença de Alzheimer esporádica (do inglês *late-onset*), a forma mais comum da doença, com cerca de 90 % dos casos<sup>2</sup>, e doença de Alzheimer familiar (do inglês *early-onset*). A doença de Alzheimer do tipo familiar afeta adultos com idades entre 30 e 60 anos, enquanto a doença de Alzheimer esporádica ocorre habitualmente após os 60 anos. Ambas as formas de Alzheimer possuem as mesmas características neuropatológicas. As causas da doença de Alzheimer são de origem multifatorial envolvendo fatores genéticos e ambientais. O maior fator de risco é a idade avançada, estando envolvidos outros fatores como histórico familiar, traumatismo craniano, género feminino, hiperlipidémia, e fatores vasculares<sup>3</sup>. Após Alois Alzheimer, em 1907, observar por exames histológicos características neuropatológicas da doença, como placas amilóides e tranças neurofibrilares (NFT) (revisto em 4) em cérebros de pacientes com doença de Alzheimer têm surgido diversas hipóteses. Estas hipóteses tentam explicar a origem multifatorial da doença. Alguns exemplos destas hipóteses são a hipótese colinérgica, a hipótese da cascata amilóide e a hipótese da proteína tau. A hipótese colinérgica foi a primeira teoria proposta e levou ao desenvolvimento dos únicos fármacos aprovados para o tratamento de doença de Alzheimer num estadio inicial a moderado<sup>5</sup>. Esta teoria baseia-se na associação da perda de atividade colinérgica observada em cérebros de pacientes com doença de Alzheimer e em estudos que sugerem o papel da acetilcolina na aprendizagem e memória (revisto em 6). Existem diversos estudos com fármacos inibidores da acetilcolinesterase que demonstraram resultados promissores na melhoria da memória de pacientes com doença de Alzheimer<sup>7</sup>, mas que não oferecem uma cura a longo prazo. Assim sendo, os investigadores continuaram a tentar encontrar uma hipótese, baseados nas anormalidades da produção da proteína tau,

da deposição de beta amiloide ( $A\beta$ ) e de mutações no gene que codifica a proteína precursora da beta amiloide (APP). A hipótese da cascata amiloide surgiu após a descoberta de pacientes com doença de Alzheimer familiar, herdada de modo autossômico dominante<sup>8</sup>. A mutação associada a esta forma da doença está localizada no gene codificante da APP, uma proteína a partir da qual o péptido  $A\beta$  é originado (revisto em 9). Esta hipótese é também apoiada pela possibilidade de uma das causas da doença de Alzheimer ser uma mutação autossômica dominante na presenilina 1 (PSEN 1)<sup>10</sup> e PSEN 2<sup>11</sup>, proteínas envolvidas no local de atividade catalítica da  $\gamma$ -secretase. Em condições normais, a enzima  $\beta$ -secretase cliva a APP em péptidos  $A\beta$  com 40 aminoácidos ( $A\beta_{40}$ ), que são formas solúveis, e que são convertidos lentamente para configuração folha- $\beta$  insolúvel de forma a serem eliminados do cérebro (revisto em 12). De acordo com esta hipótese, em condições patológicas, a APP sofre um processamento aberrante por parte das enzimas  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretase, que originam péptidos  $A\beta$  com 42 aminoácidos ( $A\beta_{42}$ ), resultando num desequilíbrio entre a produção e a depuração (do inglês, *clearance*) do péptido  $A\beta_{42}$ <sup>13</sup>, uma vez que esta molécula é mais fibrilogénica do que  $A\beta_{40}$ . Como consequência, os péptidos  $A\beta$  agregam espontaneamente em oligómeros solúveis, resultando em auto-agregados fibrilares insolúveis em conformação folha- $\beta$ . Estes podem depositar na forma de placas senis<sup>14</sup>, afetando a passagem de informação na fenda sináptica. Os oligómeros e os agregados fibrilares podem facilitar a hiperfosforilação da proteína tau, perturbar a função mitocondrial e do proteossoma e levar a falha sináptica e disfunção cognitiva<sup>12</sup>. Por outro lado, as placas senis de  $A\beta_{42}$  podem resultar na ativação da microglia, resultando na produção e libertação de citocinas pro-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) que, por sua vez, levam à produção de mais  $A\beta_{42}$ <sup>15</sup>. A tau é uma proteína altamente solúvel, estabilizadora de microtúbulos presentes nos axónios dos neurónios (revisto em 16). A hipótese da tau baseia-se em evidências onde a agregação desta proteína ocorre antes da formação das tóxicas placas  $A\beta$ , iniciando o desenvolvimento da doença<sup>17</sup>. Os autores defendem que a tau se relaciona melhor com a progressão e gravidade da doença do que com a acumulação das placas  $A\beta$ . Nesta hipótese, a tau hiperfosforilada começa a agregar, formando filamentos helicoidais emparelhados (PHF) (revisto em 16). Por sua vez, estes PHF dão origem a NFT dentro do corpo das células nervosas, comprometendo o transporte axonal. A acumulação destas formas tóxicas de proteína tau limitam o metabolismo neuronal normal, provocando a neurodegeneração progressiva. Apesar das diversas hipóteses propostas para os

mecanismos patogénéticos da doença de Alzheimer, estes continuam sem estar completamente entendidos. É certo que envolvem diferentes e complexos eventos anormais ao nível molecular e celular que culminam numa profunda perda de células nervosas e destruição sináptica, levando a uma diminuição das funções cerebrais<sup>18</sup>. Dado o conhecimento atual, discutido acima, e sabendo que existem lacunas na compreensão da patologia da doença de Alzheimer, surge uma hipótese<sup>9</sup> que apoia a maioria dos dados onde a agregação e deposição de A $\beta$  desencadeia um processo que leva à perda neuronal através da formação de PHF de tau. Continua sem estar elucidada a forma como A $\beta$  desencadeia ou acelera a patologia tau, e como esta conduz à perda neuronal.

A espectrometria de massa (MS) revolucionou a análise de lípidos e permitiu o desenvolvimento do campo da “lipidómica”. Este campo da ciência tem como objetivo a análise quantitativa e qualitativa do lipidoma num dado sistema (tecido, órgãos, células, fluídos biológicos, entre outros) (revisto em 19). O aperfeiçoamento constante dos espectrómetros de massa, em termos de resolução, sensibilidade e rapidez de análise tem melhorado drasticamente a qualidade e a robustez das análises estruturais dos lípidos. A maioria dos progressos recentes no campo analítico também tem sido impulsionado pelo rápido ritmo de desenvolvimento de novas metodologias associadas a MS em laboratórios de investigação. Contudo, uma das principais dificuldades, associadas à análise de lípidos, por estratégias de análise de MS, resulta da diversidade de estruturas químicas e das distintas propriedades físico-químicas que os diferentes lípidos apresentam, o que torna esta análise uma tarefa difícil<sup>20</sup>.

A doença de Alzheimer e o metabolismo lipídico estão altamente relacionados<sup>21</sup>. Durante os processos de envelhecimento e neurodegenerativo, as propriedades físico-químicas das membranas são alteradas. Esta alteração pode resultar de uma desregulação nas proporções dos lípidos de membrana e/ou mudanças nos rácios, podendo contribuir para esta patologia<sup>22</sup>. Torna-se, por isso, importante clarificar o papel dos glicosfingolípidos e fosfolípidos na neurodegeneração, de maneira a encontrar marcadores específicos e desenvolver abordagens de diagnóstico clínico. Os estudos que recorrem à abordagem lipidómica para a caracterização do sistema nervoso e para o estudo de doenças têm vindo a aumentar (revisto em 23). No entanto, devido à sua especificidade e complexidade, a pesquisa lipidómica no sistema nervoso apresenta bastantes desafios, uma vez que, comparativamente a outros órgãos e sistemas de

mamíferos, o sistema nervoso contém uma grande diversidade de classes e espécies lipídicas.

## **1.2. Lípidos de membrana envolvidos na doença de Alzheimer**

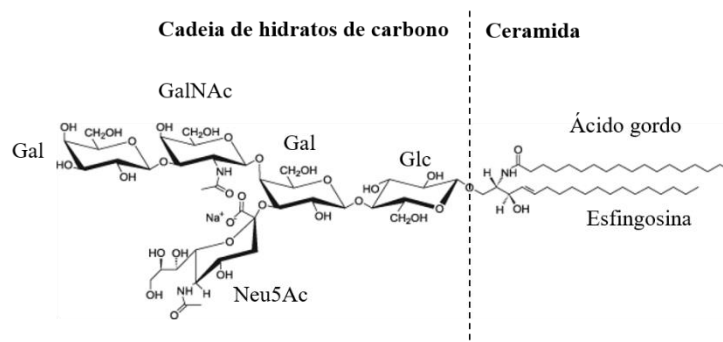
Os lípidos são um grupo de compostos orgânicos que, apesar de quimicamente diferentes entre si, apresentam características comuns, como longas cadeias hidrocarbonadas, a insolubilidade em água e a solubilidade em solventes orgânicos. Estas biomoléculas possuem diversas funções que vão desde o armazenamento de energia, a papéis cruciais como co-fatores enzimáticos, a transportadores de eletrões, de hormonas e mensageiros na sinalização celular, sendo também os principais elementos estruturais das membranas biológicas (revisto em 24). A principal característica da arquitetura das membranas biológicas é a dupla camada de lípidos que atua como barreira, impedindo a passagem de moléculas polares e de iões. Os lípidos presentes na membrana têm características anfifílicas, direcionando a organização da membrana.

A maior classe de lípidos estruturais nas membranas eucarióticas são os glicerofosfolípidos como fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI) e o ácido fosfatídico (PA)<sup>24</sup>, caracterizados pelo grupo hidrofílico (colina, etanolamina, serina e inositol). Na sua constituição apresentam uma porção hidrofóbica, o diacilglicerol, que contém dois ácidos gordos saturados ou *cis*-insaturados de variados tamanhos nas posições *sn*-1 e *sn*-2. Mais de 50 % dos fosfolípidos de membrana são PC. Os esfingolípidos são outra classe de lípidos estrutural. Os esfingolípidos apresentam uma grande variedade estrutural de subclasses que podem variar drasticamente, dependendo do tipo de células, do tipo de membranas de uma célula ou da fase de diferenciação celular (revisto em 25). Na maioria dos esfingolípidos, a base esfingóide está *N*-acetilada a um ácido gordo de cadeia longa, formando a ceramida (Cer). A Cer pode estar ligada a grupos substituintes hidrofílicos, especialmente fosfocolina no caso da esfingomielina, glucose ou galactose, no caso de glicolípidos neutros e oligossacarídeos complexos, no caso dos glicoesfingolípidos, como os gangliósidos. O papel biológico dos elementos de cada uma destas classes é muito diverso, sendo ainda pouco clara a sua função em sistemas vivos. Os níveis alterados de esfingolípidos têm sido relacionados com doenças adquiridas<sup>27</sup>, com diferentes estados de doença<sup>28</sup> e com a resposta a tratamento farmacológico<sup>29</sup>.

### 1.2.1. Perfil dos gangliósidos envolvidos na doença de Alzheimer

Os glicosfingolípídeos (GSLs) são uma subclasse de lípidos que contêm uma esfingosina e, pelo menos, um monossacarídeo ligado diretamente ao grupo hidroxilo no carbono 1 da Cer<sup>29</sup>. Encontram-se presentes, principalmente, na face externa da membrana plasmática, expondo o grupo de hidratinhos de carbono para o exterior. Esta subclasse de lípidos está dividida em GSLs neutros e ácidos, dependendo do grupo de oligossacarídeos ligados à Cer<sup>31</sup>. Estas moléculas interagem com recetores transmembranares ou transdutores de sinais envolvidos na proliferação e na sinalização celular. Os glicosfingolípídeos incluem glicolípídeos simples como a galactosilceramida e a lactosilceramida, e glicolípídeos mais complexos como os gangliósidos, que são moléculas envolvidas na adesão celular, proliferação, processos de reconhecimento e modulação das vias de transdução de sinal. Na estrutura dos gangliósidos podem ocorrer alterações em condições patológicas, incluindo aterosclerose, distúrbios neurodegenerativo e cancro<sup>32-34</sup>. Os gangliósidos têm como estrutura base *N*-acetilgalactosamina ligada a galactose, terminando com glucose e a ceramida (GalNAc $\beta$ 1,4/3Gal $\beta$ 1,4Glc $\beta$ 1-Cer). A complexidade da estrutura e de síntese destes GSLs conferem uma enorme variabilidade em relação às propriedades físico-químicas das moléculas, tornando a sua análise consideravelmente difícil (revisto em 35). Juntamente com outras metodologias, a MS tem desempenhado um papel crucial na análise estrutural de GSLs e na glicosfingolipidómica. Os gangliósidos são o objeto de estudo deste trabalho, pelo que iremos especificar com maior detalhe a estrutura e propriedades deste grupo de GSLs.

A designação “gangliósido” foi atribuída pelo bioquímico alemão Klenk (1896-1971) a um grupo de GSLs acídicos, que este isolou das células *ganglion* da retina e do cérebro de pacientes que sofriam da doença de Tay-Sachs (revisto em 36). Os gangliósidos (**Figura 1**) são GSLs complexos, presentes em células eucarióticas, altamente distribuídos por tecidos e fluídos<sup>37</sup>. A heterogeneidade de estruturas deve-se à diversidade de estruturas de açúcares, tamanho da sequência e ligações. Todas estas variações fazem dos gangliósidos uma grande família de compostos. O ácido acetilneuramínico (NeuAc), derivado do ácido neuramínico, é o açúcar comum a todos os gangliósidos e que os identifica como GSLs ácidos<sup>38</sup>. Os derivados do ácido neuramínico *N*- ou *O*- substituídos são chamados de ácidos siálicos. No cérebro humano, a estrutura maioritária é o NeuAc, seguido do *N*-acetil-9-*O*-NeuAc<sup>39</sup>.



**Figura 1** - Estrutura do gangliósido GM1.

A grande complexidade estrutural torna os gangliósidos idealmente adequados para participar na regulação de diversas funções biológicas, incluindo a de moduladores de recetores de sinalização, nomeadamente como o fator neurotrófico, de neurotransmissão e interação com proteínas reguladoras do sistema nervoso<sup>40</sup>. Os oligodendrócitos e a mielina são ricos em galactosilceramida, e derivados sulfatados, os 3'-sulfo-galactosilceramidas (sulfatido)<sup>41</sup>, representando 20 % dos lípidos nas membranas de mielina. Os gangliósidos são especialmente abundantes nas zonas pré e pós-sinápticas, comprovado por um estudo realizado em sinaptossomas, onde representam cerca de 10 a 15 % do conteúdo total de lípidos<sup>42</sup>. A expressão dos gangliósidos está relacionada com a neurogénese, sinaptogénese, transmissão sináptica e proliferação celular<sup>43</sup>. Os gangliósidos predominantes no cérebro dos mamíferos são o GM1, o GD1a, GD1b e o GT1b e correspondem a 80-90 % do conteúdo de gangliósidos<sup>44</sup>, sendo o GM1 a espécie maioritária<sup>42</sup>. Durante o desenvolvimento do cérebro, o conteúdo de gangliósidos vai sendo alterado de gangliósidos simples, GM3 e GD3, para gangliósidos mais complexos, como GD1a e GT1b<sup>45</sup>. Na superfície celular, os gangliósidos estão envolvidos no reconhecimento célula-célula, adesão e transdução de sinal dentro de microdomínios específicos da superfície celular, denominados de *rafts* lipídicos, ou microdomínios enriquecidos em GSLs (GEMs), juntamente com outros componentes da membrana como a esfingomielina e o colesterol<sup>46</sup>. Para além destas funções, os gangliósidos podem também estar presentes em organelos intracelulares, como o núcleo, tendo sido proposto que desempenham um importante papel na modulação da homeostasia intracelular de cálcio<sup>47</sup>, e a mitocôndria, onde o GD3 regula a apoptose<sup>48</sup>. A localização específica dos gangliósidos permite a interação com diversas moléculas biológicas, incluindo glicoproteínas, anticorpos, hormonas peptídicas e fatores de crescimento<sup>49</sup>.



Atualmente são conhecidos dois sistemas de nomenclatura para os gangliósidos. A maioria dos investigadores utiliza a nomenclatura abreviada de acordo com Svennerholm<sup>50</sup>. O sistema IUPAC<sup>51</sup>, mais abrangente, é menos utilizado. De acordo com Svennerholm<sup>50</sup>, a estrutura base de açúcares neutros define o nome da respetiva série, na qual as formas piranose da D-galactose (Gal), D-*N*-acetilglucosamina (GlcNAc) ou D-*N*-acetilgalactosamina (GalNAc) estão ligadas numa ordem definida e ligadas à lactosilceramida (LacCer) ou galactosilceramida (GalCer). O nome contém a informação sobre a série (“G” = ganglio, “L” = lacto), número de ácidos siálicos (“A” = 0, “M” = 1, “D” = 2, “T” = 3, “Q” = 4, “P” = 5, “H” = 6, “S” = 7), e, indiretamente, o número de hidratinhos de carbono neutros (5-n). Os ácidos siálicos podem estar ligados a diferentes posições da estrutura base. Frequentemente, os resíduos de ácido siálico são encontrados em ligações  $\alpha$ 2,3 ao resíduo galactosil, interno ou exterior da cadeia de oligossacarídeos e em ligação  $\alpha$ 2,8 a outros ácidos siálicos. Os GSLs da série ganglio da série-0 não têm nenhum ácido siálico na posição 2 da Gal; da série-a têm um, da série-b têm dois e da série-c têm três resíduos de ácido siálico. Apesar destas regras de nomenclatura, existem algumas exceções. Os gangliósidos “simples” das séries -0 e -a são expressos, principalmente, no tecido humano normal<sup>52</sup>. Os gangliósidos “complexos”, aqueles que têm 2 ou mais ácidos siálicos, estão essencialmente restritos ao sistema nervoso de adultos saudáveis, a tecidos em desenvolvimento durante a embriogénese, podendo também ser encontrados em vários tipos de cancro, como o melanoma e tumores cerebrais.

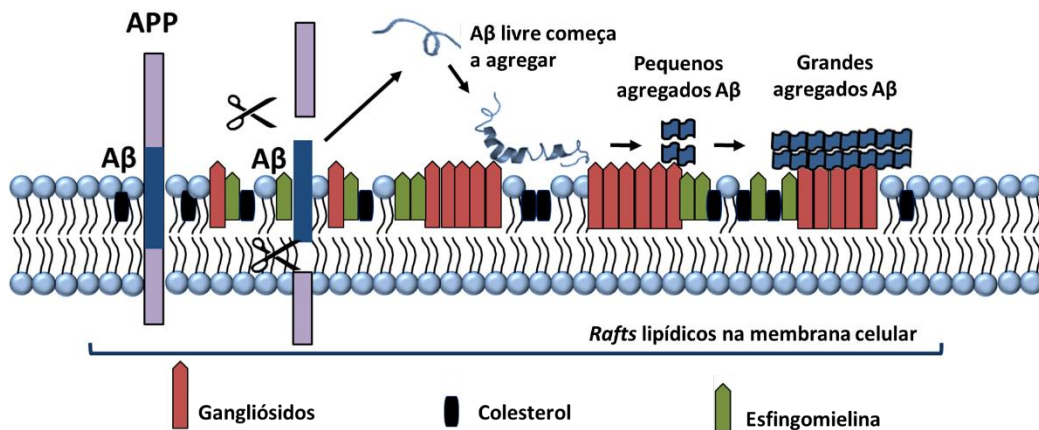
Os gangliósidos são sintetizados no retículo endoplasmático e modificados no complexo de Golgi por adição sequencial de açúcares, seguido de transporte mediado por vesículas, até à camada exterior da membrana plasmática<sup>53</sup>. A biossíntese dos gangliósidos (**Figura 2**) é um processo complexo que envolve múltiplas vias metabólicas e glicosiltransferases (GTs) (revisto em 20). Estas enzimas GTs tipo II encontram-se ancoradas à membrana e apresentam um gradiente de distribuição no interior do complexo de Golgi e formam complexos funcionais que estão associados em complexos multi-enzimáticos no *cis*-Golgi<sup>54</sup>. Dependendo da deficiência de GTs, ratinhos geneticamente modificados com defeitos na biossíntese dos gangliósidos apresentam defeitos a nível da função neuronal, reprodução ou sinalização da insulina<sup>55</sup>. A biossíntese inicia-se no *cis*-Golgi pela transferência do resíduo de glucose (Glc) da glucose-uridina difosfato (UDP)- Glc para a Cer, pela *N*-acilglucosaminidase  $\beta$ -D-glicosiltransferase (GlcCer sintase) (revisto em 20). O passo seguinte é a conversão da glucosilceramida (GlcCer) em

LacCer pela transferência da Gal da UDP-Gal, pela enzima GlcCer  $\beta$ 1,4-galactosiltransferase (LacCer sintase). A única exceção a esta via de biossíntese é o GM4, que deriva da GalCer e ocorre através da ação de três sialiltransferases (I, II, e III) altamente específicas. A transferência dos resíduos de ácido siálico para a LacCer é catalisada pela sialiltransferase ST3Gal V (GM3 sintase), ST8Sia I (GD3 sintase) e ST8Sia V (GT3 sintase), enzimas com grande especificidade para substratinhos glicolipídicos. Sendo assim, a LacCer, o GT3, o GD3 e o GT3, são os precursores das séries -0, -a, -b e -c dos gangliósidos, respectivamente (**Figura 2**). A biossíntese destes compostos determina a proporção relativa de gangliósidos em cada série. Posteriormente, os resíduos de GalNAc, Gal e NeuAc podem ser transferidos de forma gradual pela ação da enzima  $\beta$ 1,4-N-acetil-galactosaminiltransferase I (GM2/ GD2 sintase), pela ação da  $\beta$ 1,3-galactosiltransferase IV (GalT-II) e por diferentes sialiltransferases. A GM2/ GD2 sintase está ativa na quarta série dos gangliósidos, convertendo a LacCer, o GT3, o GD3 e o GT3 em GA2 (asialo- GM2), GM2, GD2, GT2, respectivamente (**Figura 2**). De igual modo, a enzima GalT-II utiliza GA2, GM2, GD2, GT2 como substratinhos aceitadores. O resíduo terminal de Gal pode ainda ser utilizado como substratinho aceitador pela  $\alpha$ 2,3-sialiltransferase. Por último, o trissacárido terminal NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1,3GalNAc pode ser substituído por outro resíduo de ácido siálico na ligação  $\alpha$ 2,8 pela ST8Sia V ou na ligação  $\alpha$ 2,6 por um resíduo GalNAc do GM1b, GD1a ou GT1b para formar a série  $\alpha$  dos gangliósidos (revisto em 20).

Os gangliósidos estão envolvidos na patologia de diversas doenças. Um exemplo é a gripe, uma doença infecciosa viral bem conhecida<sup>56</sup>. O vírus Influenza A reconhece resíduos de NeuAc de gangliósidos na superfície das células, como sendo moléculas recetoras para a invasão da molécula hospedeira. As doenças de Tay-Sachs e de Sandhoff, doenças do armazenamento lisossomal, como gangliosidoses GM1 e GM2 são causadas por defeitos presentes nas glicosidases lisossomais ou co-ativadores específicos, resultando numa acumulação de substratinhos lipídicos (revisto em 57). Recentemente, foi sugerido que o GT3 presente na superfície celular está envolvido na resistência à insulina da diabetes tipo 2<sup>58</sup>. O aparecimento da doença de Alzheimer está também relacionado com os gangliósidos, sendo estes iniciadores da agregação de A $\beta$ <sup>59,60</sup>. Mais recentemente, Ariga *et al.*<sup>34</sup> reportaram um aumento dos antígenos Chol-1 $\alpha$ , GQ1b $\alpha$  e GT1a $\alpha$ , que são expressos especificamente em neurónios colinérgicos<sup>61,62</sup>, num modelo de cérebro de ratinho transgénico para a doença de Alzheimer<sup>34</sup>. O aumento de



transformação da estrutura para folha- $\beta$ , que é mais insolúvel, promovendo a agregação de mais péptidos e a formação de agregados fibrilares. Diversos estudos reportam alterações no metabolismo dos gangliósidos em cérebro humano ou modelos de ratinho transgênicos para a doença de Alzheimer. Grimm *et al.*<sup>21</sup> demonstraram a importância das anormalidades dos lípidos e gangliósidos, juntamente com a produção patogénica de A $\beta$ , podendo estas contribuir para as condições patológicas encontradas na doença de Alzheimer. Estes autores mostraram, num estudo em fibroblastos de embrião de ratinho deficientes em PSEN 1 e 2 (MEF PSEN 1/2 -/-), que os níveis de gangliósidos aumentam 72 % em relação ao controlo, revelando a importância da PSEN na regulação da composição dos *rafts* lipídicos.



**Figura 3** - Agregação do péptido A $\beta$  através de interações com os gangliósidos presentes na membrana neuronal (adaptado de 65).

O gangliósido GM1 pode estar associado a um mecanismo de neuroprotecção, relacionado com a sua ação antioxidante através da diminuição da ativação do glutamato induzido por radicais livres em células nervosas<sup>66</sup>. Esta ação antioxidante está relacionada com a capacidade dos gangliósidos inibirem a fosfolipase A2 e a óxido nítrico sintase, enzimas responsáveis pela produção de espécies reativas de oxigénio e azoto, respetivamente<sup>67</sup>. Assim, a inibição destas enzimas pode levar à diminuição de radicais livres nas células nervosas, prevenindo a morte celular. Por outro lado, diferentes estudos demonstram que o péptido A $\beta$  têm a capacidade de se ligar ao GM1<sup>60,64</sup>. Um estudo realizado por Ariga *et al.*<sup>64</sup> mostrou que o péptido A $\beta_{40}$  se liga aos gangliósidos com grande afinidade  $GQ1b\alpha > GT1a\alpha > GQ1b > GT1b > GD1a > GD3 > GM1 > GM2 > GM3 > GM4$ , sugerindo que um elevado conteúdo de ácidos siálicos é necessário para a

ligação deste péptido. Este autor reporta ainda que o péptido A $\beta$ <sub>42</sub> se liga mais fortemente ao GM1 do que o péptido A $\beta$ <sub>40</sub><sup>64</sup>. A importância desta ligação gangliósido-A $\beta$  é enfatizada pelo facto de os péptidos solúveis A $\beta$  serem rapidamente capturados do fluído intersticial do cérebro para as membranas sinápticas onde interagem com o GM1 e outros lípidos, levando a perturbações progressivas na estrutura e função da membrana<sup>68</sup>. Os agregados fibrilares formados na presença de GM1 são muito mais neurotóxicos do que aqueles que não contém GM1<sup>60</sup>. Outro estudo realizado por Zha *et al.*<sup>69</sup>, onde foi estudada a influência do GM1 nas vias de processamento da APP, reportou que o GM1 exógeno (gangliósido que não se encontra na membrana celular) promove a biogénese de A $\beta$  e diminui a secreção de sAPP $\alpha$  em linhas celulares. A sAPP $\alpha$  é um produto da clivagem da  $\alpha$ -secretase, que previne a formação do péptido tóxico A $\beta$ , sugerindo o papel regulador do GM1 no processamento da APP<sup>69</sup>, inclusive no aumento da atividade da enzima  $\gamma$ -secretase<sup>21</sup>. Através de técnicas de imunohistoquímica em *rafts* lipídicos isolados de cérebros de pacientes com doença de Alzheimer, foi possível observar um aumento de GM1 e GM2<sup>70,71</sup>. Os autores sugerem que estes gangliósidos aceleram, nas fases iniciais da doença, a formação de placas de A $\beta$  tóxicas causando disrupção do *raft* e, consequentemente, levando à neurodegeneração.

O gangliósido GD3 tem uma função reguladora na proliferação celular e nos processos de diferenciação<sup>48</sup>. Este gangliósido é um fator fundamental para diversas vias apoptóticas, incluindo a morte celular induzida pela A $\beta$ <sup>72</sup>. Grimm *et al.*<sup>73</sup> propuseram que o GD3 regula positivamente a clivagem da APP, aumentando a quantidade de péptidos A $\beta$  livres. Estudos recorrendo ao uso de ratinhos transgénicos com doença de Alzheimer e *knockout* da enzima GD3 sintase revelam um possível alvo terapêutico, uma vez que permite reduzir a agregação de A $\beta$ , o *stress* oxidativo e a apoptose mediada por níveis elevados de GD3<sup>59</sup>. A estabilidade da mielina e da função dos axónios são dependentes da interação de GD1a e GT1b, os dois gangliósidos mais abundantes nas membranas axonais, com glicoproteínas associadas à mielina (MAG) (revisto em 74,75). A MAG é uma proteína que se liga a ácidos siálicos. O GD1a e o GT1b são ligandos específicos da MAG, e a ausência da enzima GM2/GD2 sintase em fibras de mielina resulta num comprometimento da fosforilação de neurofilamentos axonais, espaçamento aberrante entre axónios e diminuição da dimensão dos axónios. A ligação específica entre estes gangliósidos e MAG confere um efeito protetor contra a toxicidade axonal induzida por neurotoxinas, a partir da estabilização de microtúbulos nos axónios. Os gangliósidos estão

envolvidos na função sináptica, especialmente o GQ1b que estimula a atividade sináptica, aumentando a potenciação de longa duração da transmissão sináptica, que está na base da aprendizagem e memória (revisto em 76). Um estudo realizado em ratinhos transgênicos induzidos com AP-1 e A $\beta$ <sub>42</sub> durante o envelhecimento reportou o aumento do GQ1b $\alpha$ <sup>77</sup>. A *up-regulation* do GQ1b $\alpha$  pode servir como um mecanismo compensatório relacionado com o declínio da função colinérgica com a idade e para produção de neurónios.

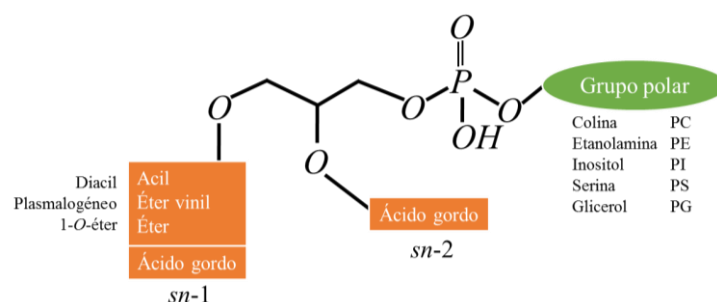
A presença de espécies com modificações como a *O*-acetilação é um facto reportado na literatura como uma das modificações covalentes mais comuns nos gangliósidos<sup>78</sup>. É uma modificação estrutural pequena que tem um grande impacto nas propriedades fisiológicas dos gangliósidos. A acetilação de ácidos siálicos promove a proteção contra a degradação por sialidases, está associada a tecidos numa fase de desenvolvimento avançado, e está ligada à progressão e propagação tumoral<sup>78,79</sup>. Nem todas as espécies de gangliósidos podem sofrer esta modificação, uma vez que o mecanismo de *O*-acetilação requer porções de oligossacarídeos específicos.

O glicoma de cada animal contém glicoproteínas, glicolípidos e proteoglicano em diferentes proporções (revisto em 80). No cérebro, os glicolípidos são as moléculas mais abundantes, incluindo galactosilceramidas e o seu derivado sulfatado que são componentes principais dos lípidos da mielina e células nervosas. O cérebro adulto expressa gangliósidos altamente complexos. A sialilação está associada à formação do complexo GM1-A $\beta$  altamente neurotóxico<sup>81</sup>. Patel *et al.*<sup>82</sup> demonstraram que o péptido A $\beta$  se liga com maior afinidade perto de aglomerados de resíduos de ácidos siálicos na superfície da célula. A remoção dos ácidos siálicos da superfície da celular, através do tratamento com sialidases, anula a citotoxicidade induzida pelo péptido A $\beta$  na cultura celular<sup>83</sup>.

Os gangliósidos têm um efeito neuroprotetor em modelos *in vivo* e *in vitro* de lesão neuronal. No entanto, os mecanismos associados a este efeito ainda são desconhecidos. Por outro lado, sabe-se que os gangliósidos estão presentes em grandes quantidades nas membranas neuronais e têm capacidade de se ligar ao péptido A $\beta$  e à APP, estando por isso envolvidos nas mudanças conformacionais destas moléculas e, consequentemente, na patogénese da doença de Alzheimer.

### 1.2.2. Perfil dos fosfolípidos envolvidos na doença de Alzheimer

Os glicerofosfolípidos (**Figura 4**) são lípidos polares presentes em todos os tecidos como componentes essenciais da membrana celular (revisto em 84). A importância biológica dos fosfolípidos provém das suas qualidades anfifílicas, que permitem a existência de membranas. Para além do papel estrutural das membranas, estas possuem importantes papéis fisiológicos devido à presença de proteínas e fosfolípidos que funcionam como precursores de lípidos mediadores. Assim sendo, os fosfolípidos participam numa variedade de processos metabólicos, neurológicos e de sinalização celular<sup>85</sup>. A maioria dos fosfolípidos das células de mamíferos é sintetizada no retículo endoplasmático, exceto a cardiolipina e uma fração significativa de PE, que são sintetizadas na mitocôndria<sup>86</sup>.



**Figura 4** – Diferentes tipos de fosfolípidos, na posição *sn*-1 possível ligação acil, éter vinil e éter; *sn*-2 ácido gordo e grupo polar em *sn*-3 do glicerol (adaptado de 87).

O cérebro humano adulto contém uma grande quantidade de lípidos, entre 4,5-5,4 %<sup>23</sup>. Em comparação com outros órgãos, o cérebro contém a maior diversidade de classes de lípidos e de espécies moleculares. A alteração dos fosfolípidos leva à instabilidade da membrana e perda sináptica, contribuindo para a doença de Alzheimer (revisto em 88). A principal indicação de que os lípidos têm um papel importante no processamento da APP e produção de A $\beta$  está associada ao facto de que todas as proteínas envolvidas são proteínas integrais de membrana<sup>89</sup>. Diferentes tipos de lípidos como glicoesfingolípido, fosfolípidos aniónicos (PA, PI e PS) e esteróis, estão envolvidos na modulação da atividade da enzima  $\beta$ -secretase<sup>90</sup> que, por sua vez, está envolvida na formação do péptido neurotóxico A $\beta$ . Diferentes estudos foram realizados associando os fosfolípidos e o início e progressão da doença de Alzheimer.

A classe de fosfolípidos PC é a classe mais abundante de lípidos presentes no cérebro<sup>91</sup>. Para além de ser o maior componente estrutural das membranas, as PC são

também importantes fontes de diversas moléculas sinalizadoras como o PA, o diacilglicerol, lisofosfatidilcolina (LPC) e ácido araquínóico<sup>92</sup>. As espécies mais abundantes no cérebro são a PC 32:0 (16:0/16:0), a PC 34:1 (16:0/18:1) e a PC 36:1 (18:0/18:1) (revisto em 93). A composição em PCs varia de acordo com a área do cérebro, o que está associado a estruturas de membranas especializadas, como a mielina e as membranas sinápticas. A perda de uma grande quantidade de PCs é suficiente para induzir a morte celular<sup>92</sup>.

A neuroinflamação é um mecanismo de proteção, realizado por todas as células neuronais, que isola a área danificada da área normal do tecido cerebral, destruindo as células afetadas e reparando a matriz extracelular, restaurando o normal funcionamento do cérebro (revisto em 94). É uma característica associada às principais doenças do sistema nervoso. As células da microglia iniciam uma rápida resposta que envolve a migração celular, proliferação e libertação de citotoxinas, estimulando a atividade da fosfolipase A2. Isto resulta num colapso dos fosfolípidos de membrana, com libertação do ácido araquidónico (20:4) e ácido docosahexaenóico (22:6). A oxidação destes produtos leva à formação de moléculas anti-inflamatórias. Por outro lado, a fosfolipase A2 leva à formação de lisofosfolípidos, como a LPC<sup>95</sup>, que gera uma rápida indução da destruição e remoção da mielina de cérebros adultos<sup>96</sup>. Na doença de Alzheimer, a atividade desta enzima encontra-se alterada<sup>97</sup>. A análise de cérebros de pacientes com doentes de Alzheimer familiar (ou *early stage*) mostrou que a atividade da fosfolipase A2 se encontra diminuída<sup>97</sup>. À medida que a doença se agrava, a atividade desta enzima aumenta, o que sugere a indução da inflamação através da ativação da via do ácido araquidónico. Como produto da atividade da fosfolipase A2, os níveis de LPC podem encontrar-se alterados, induzindo neuroinflamação e neurodegeneração<sup>98</sup>.

A classe PE é a segunda classe mais abundante nas células de mamíferos no folheto interno, estando o cérebro particularmente enriquecido desta classe (revisto em 86). A PE está envolvida em processos de fusão de membrana do tipo não-lamelar, modelação da curvatura da membrana e é um importante precursor e substratinho de diversas vias biológicas<sup>99</sup>. A PE pode ser apresentada sob a forma de lípidos diacil, compostos por glicerol-3-fosfato esterificado em resíduos de acil nas posições *sn*-1 e *sn*-2, ou sob a forma de plasmalogéneos (ou forma plasmenil), uma ligação éter vinílica na posição *sn*-1 e uma ligação éster na posição *sn*-2 (revisto em 86). Um estudo realizado por Prasad *et al.*<sup>100</sup>, em cérebro de pacientes com doença de Alzheimer, demonstrou que



os níveis de PE se encontravam reduzidos. Estes autores justificam que a redução dos níveis de PE está associada à natureza da sua estrutura, que contém grandes quantidades de ácidos gordos polinsaturados. Assim, a fosfolipase A2 atua seletivamente sobre estes fosfolípidos, tal como na PC, libertando os ácidos gordos polinsaturados, que poderão ser alvos de peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica causada pelos radicais livres podem gerar espécies tóxicas, danificando a membrana celular e levando à morte dos neurónios e progressão da doença<sup>101</sup>. Os fosfolípidos da classe da PE podem sofrer ação da fosfolipase A2, dando origem às lisofosfatidiletanolaminas (LPE). A LPE é um componente minoritário da membrana celular. Wood *et al.*<sup>102</sup> demonstraram que os níveis de LPE, monitorizados em plasma de pacientes com comprometimento cognitivo, se encontram aumentados devido à atividade da fosfolipase A2. Os fosfolípidos representam cerca de 40 % dos lípidos da mielina, sendo uma grande porção, cerca de 1/3, a fosfatidiletanolamina na forma de plasmalogéneo (PEp). O PEp é caracterizado pela presença de uma ligação éter vinílica na posição *sn*-1<sup>86</sup>. Este plasmalogéneo tem um importante papel no mecanismo antioxidante das membranas celulares<sup>103</sup> e compõe uma das mais abundantes espécies da classe PE. Uma das perturbações no conteúdo lipídico presente em pacientes com Alzheimer está associado à redução de PEp em estados antecipados da doença clinicamente reconhecíveis, como um défice cognitivo ligeiro (MCI)<sup>104</sup>. Os seus níveis tendem a diminuir com a progressão da doença. Um estudo realizado por Bennett *et al.*<sup>105</sup> demonstra que a diminuição dos níveis de PEp (16:0/22:6) está associada à severidade da doença e que a acumulação de metabolitos de PEp, como a liso-PEp (16:0), pode estar envolvida na aceleração da patologia da tau, aumentando a libertação de vesículas que levam à depleção das mesmas e, consequentemente, perda da sinalização neuronal.

A classe PG é um componente minoritário em diversas membranas intracelulares, correspondendo a menos de 1 % do total de fosfolípidos, estando maioritariamente presente na membrana da mitocôndria e microssomal (revisto em 106). Para além da sua função na homeostasia da membrana celular, esta classe está envolvida na sinalização celular de inúmeros processos celulares. Os PG são potenciais ativadores da família da proteína cinase C<sup>107</sup> e precursores da cardiolipina. Um estudo realizado em diferentes tipos de membrana, revelou que a presença de PG na membrana influencia a transição do péptido A $\beta$ <sub>40</sub> para folha- $\beta$ , diminuindo a solubilidade do péptido e levando à sua agregação<sup>108</sup>.

O metabolismo das PIs existentes nas membranas gera diversos mensageiros secundários<sup>105</sup>. A diferente distribuição de metabolitos de PI fosforilados é algo necessário para a montagem e remodelação de complexos envolvidos na regulação da neurotransmissão. Nos neurónios, este processo depende da interação com PI-4,5-bisfosfato encontrado em maior concentração na densidade pré-sináptica. A sua diminuição compromete a libertação dos neurotransmissores. Estudos detetaram a redução do conteúdo global de PI no córtex temporal de pacientes com doença de Alzheimer<sup>109</sup>. Uma análise por LC-ESI-MS em modelos de ratinho deficientes em apolipoproteína E (ApoE) identificou a diminuição das espécies PI(16:0/20:4), PI(16:0/22:6) e PI(18:2/22:6) associadas a membranas sinápticas<sup>110</sup>. Estas alterações, para além de prejudicarem a libertação de neurotransmissores, aumentam a atividade da  $\gamma$ -secretase, responsável pela clivagem da APP em A $\beta$ . Por outro lado, as mutações na PSEN1 e PSEN2, associadas da doença de Alzheimer do tipo familiar, prejudicam o metabolismo de PI-4,5-bisfosfato, reduzindo os seus níveis em membranas pré-sinápticas e vesiculares<sup>111</sup>. Nesta experiência, os autores demonstraram ainda que PI-4,5-bisfosfato se encontra *down-regulated* em resposta à sinaptotoxicidade do péptido A $\beta$ <sub>42</sub>. Os dados destes autores sugerem que um desequilíbrio no PI-4,5-bisfosfato pode contribuir para a patogénese da doença de Alzheimer, afetando diversas vias celulares.

A classe PS é um constituinte minoritário da maioria das membranas celulares, constituindo 2 a 20% da membrana intracelular<sup>24</sup>. Em cérebros adultos saudáveis, a mielina está enriquecida com PS<sup>112</sup>. A PS é um componente estrutural do retículo endoplasmático, invólucro nuclear, folheto interior das membranas e mielina (revisto em 113). A PS está associada a funções importantes dentro e fora da célula, como a cascata de coagulação e a apoptose<sup>114</sup>. Cerca de 20 a 30 % da PS na matéria cinzenta do cérebro humano é PS (18:0/22:6)<sup>112,115</sup>. A presença do ácido gordo 22:6 na PS neuronal tem uma importância funcional. No córtex, a redução desta espécie está associada com a progressão de MCI<sup>116</sup>. Consequentemente, a incorporação deste fosfolípido nas membranas é sensível à presença de PS e PS que contenha na sua composição 22:6<sup>115</sup>. A presença de PS na membrana neuronal influencia o metabolismo de neurotransmissores como acetilcolina e serotonina, entre outros (revisto em 113). A ativação pós-sináptica do sinal transdutor dada pela passagem do neurotransmissor, requer a interação entre o neurotransmissor e a PS presente na membrana, que necessita da carga negativa dada pelo grupo polar da PS. O envelhecimento está associado à perda neuronal, perda de conexões

sinápticas e composição anormal dos lípidos da membrana dos neurónios (revisto em 113). Uma diminuição no rácio PS/colesterol causa alterações neuroquímicas que podem contribuir para um aumento da viscosidade das membranas, reduzindo a atividade enzimática, características elétricas dos neurónios, prejudicando o funcionamento dos mesmos<sup>117</sup>. Em pacientes com MCI<sup>118</sup> e em modelos duplo transgênicos de ratinho APP-PSEN1<sup>119</sup> a atividade da flipase, que é responsável pela translocação da PS nas bicamadas sinápticas, encontra-se reduzida, resultando na acumulação de PS no folheto externo. Estas alterações podem prejudicar a transmissão sináptica. Num trabalho realizado por Shea<sup>120</sup>, onde incubaram a tau com PS ou PC e proteína associada a microtúbulos cinase, demonstrou-se que os fosfolípidos afetam a fosforilação da proteína tau. A fosforilação da tau ocorre em epítopes de PHF, aumentando a reatividade da tau. O autor concluiu que estes dados sugerem que a normal ligação entre a proteína tau e os fosfolípidos é quebrada, levando a uma acumulação da proteína tau, tornando-a mais suscetível à hiperfosforilação. Por outro lado, a suplementação de PS a pacientes com doença de Alzheimer mostra efeitos benéficos. Diversos estudos<sup>121,122</sup> demonstram melhorias significativas na memória, processamento de informação e capacidade de realizar atividades do dia-a-dia, normalmente em pacientes menos severamente afetados. No entanto ainda não foi demonstrada a possibilidade de esta aproximação terapêutica atenuar a progressão da doença.

O 3-*O*-sulfogalactosilceramida foi o primeiro sulfoglicolípido a ser isolado do cérebro humano<sup>123</sup>. Os sulfatidos possuem diferentes estruturas, variando no tamanho do ácido gordo e do tipo de Cer. As principais espécies dos sulfatidos são compostas pela Cer d18:1 com um ácido gordo hidroxilado e 22 carbonos (22:0 (2OH)), 23:0(2OH), 24:0(2OH) e 24:1(2OH) ou com um ácido gordo 24:0 e 24:1 (revisto em 124). Os sulfatidos estão localizados em órgãos como rins e cérebro, particularmente no complexo de golgi, membrana celular e lisossomas. No sistema nervoso, os sulfatidos são abundantes na bainha de mielina<sup>125</sup>. Estes lípidos funcionam como reguladores negativos da diferenciação dos oligodendrócitos<sup>126</sup> e estão envolvidos num aumento da sobrevivência dos oligodendrócitos<sup>127</sup>. As espécies com ácidos gordos hidroxilados apenas estão presentes na matéria cinzenta do cérebro, e nas formas não hidroxiladas na matéria branca. Os sulfatidos com ácidos gordos hidroxilados estão associados à estabilidade da mielina<sup>128</sup>. Por outro lado, estes lípidos estão ligados a processos de manutenção da mielina e afetam a sinalização glia-axónio (revisto em 124).

Consequentemente, os sulfatidos podem afetar propriedades funcionais de proteínas de membrana, como canais de iões, recetores e transportadores, estando a sua expressão anormal associada a sintomas neurológicos. A acumulação de sulfatidos nos neurónios causa convulsões letais em ratinhos. A perda de sulfatidos na doença de Alzheimer é mais severa na matéria cinzenta (cerca de 90%) comparando com a perda de cerca de 50 % na matéria branca<sup>129</sup>. Diferentes estudos que recorrem à técnica de MS<sup>129</sup> e cromatografia em camada fina<sup>130</sup> mostraram que os níveis de sulfatidos se encontram reduzidos. Um estudo em ratinhos deficientes em ApoE demonstra o aumento dos níveis de sulfatidos no cérebro, comparativamente a ratinhos *wild-type*<sup>131</sup>, associando a presença de ApoE à regulação dos níveis de sulfatidos. No entanto, um estudo realizado por Yuki *et al.*<sup>128</sup>, em cérebros de pacientes com doença de Alzheimer, reportam que os níveis de sulfatidos são similares aos níveis medidos no grupo controlo.

Assim, há diversas evidências que demonstram a ligação entre as alterações dos fosfolípidos e os processos de patogénese da doença de Alzheimer. Existem diversas linhas de pesquisa que trabalham para estudar os lípidos, desde os aspetos mais básicos, associados aos mecanismos da doença, até aos fatores de risco epidemiológicos e abordagens terapêuticas. O conhecimento alargado das causas da doença de Alzheimer pode ajudar na procura de novos biomarcadores, fatores de risco e abordagens terapêuticas.

### **1.3. Abordagem lipidómica no estudo de gangliósidos e fosfolípidos**

A lipidómica tem suscitado um grande interesse da comunidade científica, devido à íntima ligação de diversas patologias humanas a distúrbios lipídicos, levando a que se questione a relevância destes metabolitos na homeostasia celular (revisto em 132). A variedade estrutural e funcional dos metabolitos lipídicos, tornam a sua abordagem analítica bastante complexa. A estratégia mais comum para a análise de uma mistura de lípidos passa pela extração, purificação, separação e, posteriormente, a deteção e identificação recorrendo a MS. Esta técnica é também importante para a análise de extratinhos lipídicos sem uma pré separação - *shotgun lipidomics* (**Figura 5**). As técnicas de preparação da amostra normalmente utilizadas são a cromatografia em camada fina (TLC) e a extração em fase sólida (SPE), seguindo-se a separação das diferentes classes lipídicas por cromatografia associada a detetores. O acoplamento da separação por cromatografia à deteção por MS ou espectrometria de massa em tandem (MS/MS) levou a

uma evolução na qualidade do conhecimento estrutural, na identificação e na quantificação dos lípidos<sup>133</sup>. De forma a desenvolver ensaios qualitativos e quantitativos fiáveis, têm sido desenvolvidas várias técnicas de extração e análise de gangliósidos e fosfolípidos a partir de extratinhos lipídicos.

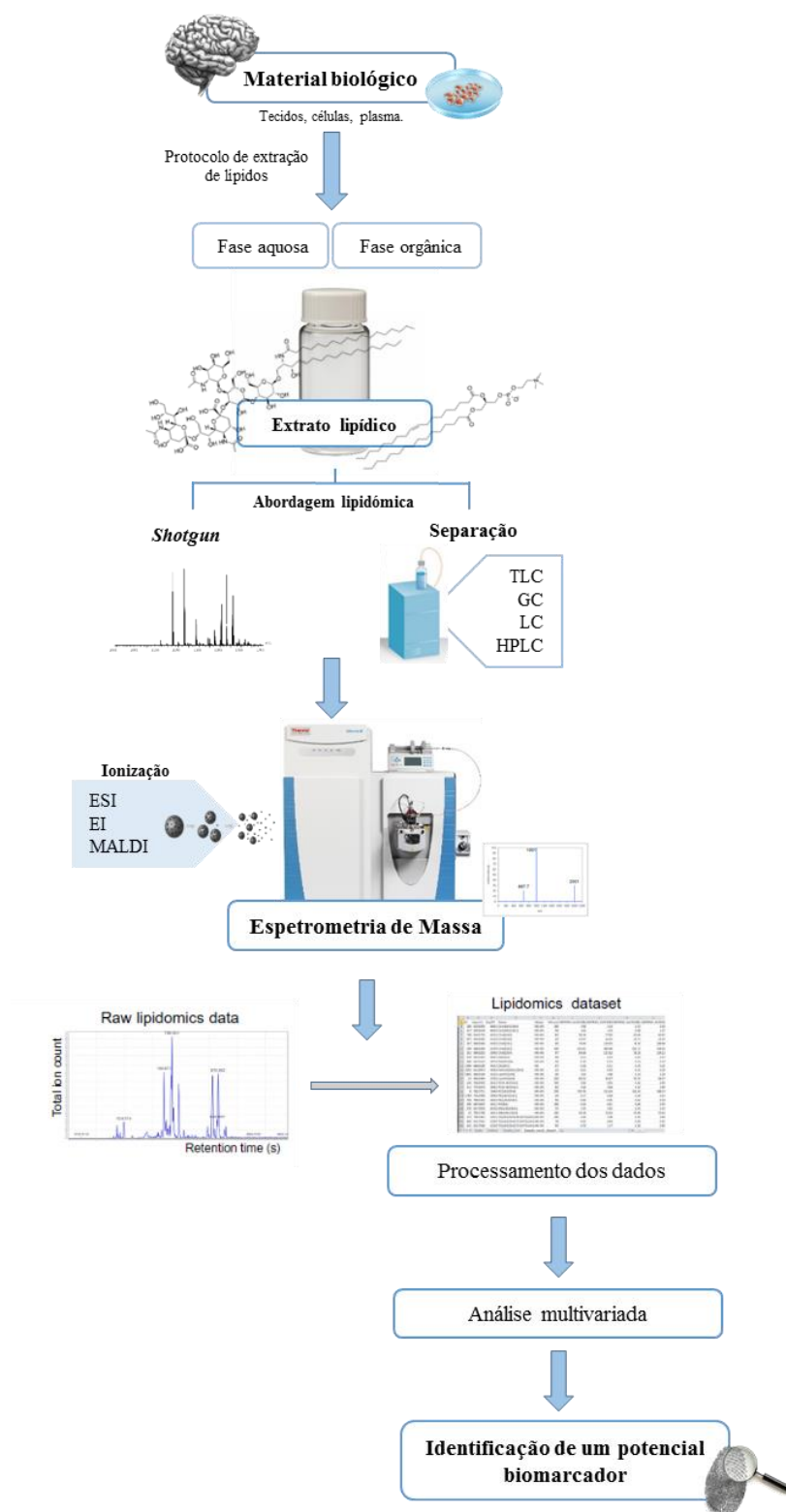
Num fluxo de trabalho típico para a análise de lípidos por MS (**Figura 5**) a amostra biológica (tecido, célula ou fluído biológico) é sujeita a um protocolo de extração líquido/líquido, tirando partido da natureza anfifílica dos GSLs, recorrendo ao método de Svennerholm e Fredman<sup>134</sup> com uma mistura de clorofórmio, metanol e água e do método de Folch<sup>135</sup> com uma mistura de metanol e clorofórmio na proporção de 1:2. Após a extração líquido/líquido, os fosfolípidos são recolhidos da fase orgânica e os gangliósidos da fase aquosa. Tipicamente, após a extração líquido/líquido continua a existir uma grande quantidade de impurezas, sendo necessário um passo adicional de enriquecimento da amostra. A utilização de colunas de gel Sephadex ou de DEAE-Sephadex<sup>136</sup> são abordagens comuns onde as moléculas são separadas por tamanho ou por carga, respetivamente (revisto em 19). Como alternativa à filtração em gel Sephadex existe a SPE que permite também a concentração e purificação dos gangliósidos de acordo com as suas propriedades físico-químicas. A técnica de SPE é fácil, rápida e reproduzível, sendo por isso utilizada pelos investigadores para obter elevados rendimentos de gangliósidos purificados. Sorensen *et al.*<sup>137</sup> e Kirsch *et al.*<sup>138</sup> desenvolveram técnicas em SPE para extração de gangliósidos com cartuchos C8 e C18, respetivamente.

Diferentes métodos de extração de lípidos polares, como os fosfolípidos, são baseados no método desenvolvido por *Blight and Dyer*<sup>139</sup>. De um modo geral, são usados dois solventes orgânicos, metanol e clorofórmio, resultando numa separação de fases. Esta separação permite retirar os materiais hidrofílicos e as proteínas, resultando numa concentração de lípidos polares (revisto em 140). Este tipo de métodos, baseados na extração líquido/líquido, envolve vários passos de separação de fase, centrifugação e evaporação de solvente.

Os gangliósidos e os fosfolípidos podem ser separados por cromatografia utilizando diferentes fases estacionárias como colunas de fase normal, de fase reversa ou de cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC), associadas a MS. A cromatografia líquida (LC) de fase normal<sup>137,141</sup> e a HILIC<sup>142</sup> separam espécies lipídicas de acordo com o grupo funcional hidrofílico. As características das colunas, como o tamanho da partícula, o grau de substituição da sílica e o tamanho da cadeia carbonada afetam a

separação dos lípidos. Têm sido realizados vários estudos para identificação e quantificação de gangliósidos de amostras biológicas complexas, como produtos da dieta<sup>137</sup>, plasma humano<sup>143</sup> ou cérebro de ratinho<sup>144</sup> usando colunas de fase normal ou reversa. Outros autores<sup>145,146</sup> recorrem a cromatografia gasosa –MS (GC-MS), com método de ionização impacto eletrónico (EI), para a análise de gangliósidos, possibilitando a análise da base esfingóide e as cadeias de ácidos gordos, após hidrólise e derivatização, fornecendo informação especialmente isómeros cis/trans<sup>147</sup>. A utilização de GC é bastante limitada pela volatilidade da amostra, pela facilidade de degradação a altas temperaturas e derivatização, podendo, por vezes, eliminar informação estrutural, sendo por isso pouco recomendada para a separação e identificação de componentes intatas de misturas complexas de gangliósidos<sup>133</sup>. No entanto, a utilização de GC-MS para a análise de fosfolípidos é extremamente utilizada, possibilitando o estudo das estruturas dos ácidos gordos presentes na amostra<sup>148</sup>.

Estas metodologias permitiram o estudo dos lípidos em amostras biológicas, ajudando na compreensão da sua função na patologia da doença de Alzheimer. Inicialmente é necessário um passo de extração de lípidos, recorrendo à extração líquido/líquido com uma mistura de clorofórmio, metanol e água. Os gangliósidos, possuem um grande grupo polar, tendo maior tendência para migrar para a fase aquosa, comparativamente com os fosfolípidos que permanecem na fase orgânica. De forma a enriquecer a amostra, a fase aquosa da mistura é submetida a SPE em cartuchos Sep-Pak C18, o que permite obter elevados rendimentos de gangliósidos purificados. Para a separação dos glicolípidos, a técnica mais utilizada é a LC utilizando a coluna HILIC, permitindo a separação desses lípidos de acordo com as suas características hidrofílica. Por último, é utilizada a cromatografia acoplada a MS ou MS/MS que permite o conhecimento estrutural e a identificação das classes lipídicas.



**Figura 5** – Fluxograma de trabalho típico para análise lipidômica por espectrometria de massa (adaptado de 149). TLC – Cromatografia em camada fina; GC – Cromatografia gasosa; HPLC - Cromatografia líquida de alta performance; LC – Cromatografia líquida; ESI - Ionização por *eletrospray*; EI - Impacto eletrônico; MALDI - Ionização por adsorção por laser associada a matriz.

## 1.4. Objetivo

A doença de Alzheimer e o metabolismo lipídico estão altamente relacionados. Durante os processos de envelhecimento e neurodegenerativo, as propriedades físico-químicas das membranas são alteradas. Esta alteração pode resultar de uma desregulação nas proporções dos lípidos de membrana e/ou mudanças nos rácios. Torna-se, por isso, necessário compreender as alterações do perfil dos gangliósidos e fosfolípidos na neurodegeneração, de maneira a encontrar marcadores específicos e desenvolver abordagens de diagnóstico clínico. Este trabalho procura identificar quais as espécies lipídicas que se encontram alteradas na doença de Alzheimer, utilizando um modelo de ratinho transgénico, podendo resultar num conjunto de lípidos específicos para reconhecer esta doença. Uma vez que os lípidos são importantes componentes da membrana celular, é importante entender a alteração do perfil de lípidos em cérebro de ratinho transgénico para a doença de Alzheimer. Assim, o objetivo do nosso trabalho passa por identificar quais os fosfolípidos e gangliósidos que se encontram alterados nesta patologia, e analisar as suas alterações e possíveis causas e consequências.

A MS revolucionou a análise de lípidos, permitindo o aparecimento da “lipidómica” que tem como objetivo analisar o lipidoma num dado sistema. Assim, neste trabalho, utilizaremos uma abordagem lipidómica para separar, identificar e semi-quantificar os níveis de fosfolípidos e gangliósidos expressos no cérebro de ratinhos triplo transgénico para a doença de Alzheimer. Este trabalho permitirá reconhecer novos marcadores para a doença de Alzheimer e elucidar a função destes tipos de lípidos nesta doença.



## **Capítulo 2 – Materiais e Métodos**



## 2.1. Reagentes

Os cérebros de modelo transgênico de ratinho para a doença de Alzheimer foram gentilmente cedidos pelas Doutora Rosa Resende e Doutora Cláudia Pereira do Centro de Neurociências e Biologia Celular, Coimbra. Os padrões de fosfolípidos 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfo-(1'-mio-inositol) (PI 16:0/16:0), 1-nonadecanoil-2-hidroxi-*sn*-glicero-3-fosfocolina (LPC 19:0), 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (PC 14:0/14:0), 1,2-ditetradecanoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (PE 14:0/14:0), 1,2-ditetradecanoil-*sn*-glicero-3-fosfo-(1'-*sn*-glicerol) (PG 14:0/14:0), 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina (PS 14:0/14:0) foram obtidos de *Avanti® Polar Lipids*, Inc (Alabaster, AI, USA) e usados sem qualquer purificação adicional.

O metanol (CH<sub>3</sub>OH) (grau HPLC) e clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>) (grau HPLC) foram adquiridos na *Fisher Scientific Ltd.* (Leicestershire, UK) e utilizados sem qualquer purificação adicional. A água (H<sub>2</sub>O) Milli-Q (Synergy®, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) utilizada foi filtrada através de um filtro de 0,2 mm e purificada recorrendo a um sistema *Millipore Milli-Q* (Milli-Q plus 185). Os reagentes para a quantificação de fosfato 70% ácido perclórico (Panreac, Espanha), molibdato de amónio (Riedel-de Haën, Alemanha), ácido ascórbico (VER BDH Prolabo, Reino Unido), hidrogenofosfato de sódio dihidratado (Riedel-de Haën, Alemanha) foram utilizados sem qualquer purificação adicional.

## 2.2. Animais e protocolo experimental

O uso de modelos transgênicos de doença de Alzheimer é uma técnica promissora para entender os mecanismos e causas da doença. Nesta experiência foram utilizados 10 ratinhos com 14 meses, dos quais 5 possuíam 3 mutações associadas à doença de Alzheimer do tipo familiar (3xTG-AD)<sup>150</sup>, APP *Swedish*, MAPT P301L e PSEN1 M146V. Este modelo transgênico de doença de Alzheimer é o único que apresenta a patologia de Aβ e tau, e mimetiza a doença de Alzheimer humana. Foram utilizados dois grupos de animais: ratinhos não transgênicos foram utilizados como controlo (NonTg, n=5) e modelo de ratinho triplo transgênico (n=5). Os ratinhos 3xTG-AD são viáveis, férteis e não exibem nenhuma anomalia física ou comportamental. A tradução da sobre-expressão dos transgenes parece restrita ao sistema nervoso central, incluindo o hipocampo e o córtex central. Estes ratinhos desenvolvem uma neuropatologia progressiva relacionada com a idade, incluindo as placas e os emaranhados.

### 2.3. Preparação da amostra

Os cérebros de ratinho foram obtidos de modelo transgênico de ratinho 3xTg-AD de doença de Alzheimer. O cérebro foi homogeneizado em 3 mL de H<sub>2</sub>O Milli-Q, utilizando um rotor AT-MD 10 (FALC, Reagente 5 - Química e Eletrônica, Ltd). De seguida, utilizou-se uma sonda de ultrassons (diâmetro da ponta 6 mm) Vibra Cell™ VCX 130 (tempo = 1 minuto, em pulsos 10 segundos ON, 10 segundos OFF, amplitude = 70 %) (SONICS, Reagente 5 - Química e Eletrônica, Ltd) para completar a homogeneização.

### 2.4. Quantificação da proteína total

A concentração de proteína total das amostras controlo (n=5) e transgênicos (n=5) foi quantificada de acordo com o método do ácido bicinonínico<sup>151</sup>, recorrendo ao uso de um kit da *ThermoFisher Scientific*. Previamente, realizou-se uma centrifugação (*Sigma Laborzentrifugen 2k15*) a 4 °C, durante 15 minutos a 14000 rpm. As soluções de reagente A (sulfato de cobre II 4 %) e reagente B (ácido bicinonínico) foram preparadas de fresco e misturadas num reagente combinado. Para os padrões foram preparadas soluções de proteína albumina bovina sérica com concentrações entre 0 e 2000 µg/ mL. A cada 25 µL de padrão e 5 µL de amostra e 20 µL de H<sub>2</sub>O foram adicionados 200 µL de reagente combinado. Deixou-se a incubar (Eppendorf® *Termomixer compact*) durante 30 minutos, a 37 °C. Por fim, a leitura de absorvância a 562 nm é realizada numa microplaca de 96 poços, em duplicado, com auxílio de um leitor de microplacas (*Thermo Scientific Multiskan Go*).

### 2.5.Extração de gangliósidos de homogeneizado de cérebro

Os gangliósidos do cérebro foram extraídos de um volume de 0,5 mL de homogeneizado ([proteína]<sub>controlo</sub> = 4,60 µg/µL; [proteína]<sub>transgênico</sub> = 2,80 µg/µL), usando o protocolo adaptado de Bian *et al.*<sup>152</sup>. A extração seguiu o método de clorofórmio-metanol-água (5:5:1, v/v/v). Ao homogeneizado adicionou-se 2,5 mL de metanol, seguindo-se 30 segundos de sonicador (*Selecta Ultrasons*) e vortex. Posteriormente, adicionou-se 2,5 mL de clorofórmio, agitou-se, e adicionou-se 0,5 mL de H<sub>2</sub>O Milli-Q. A solução foi submetida a agitação contínua numa incubadora orbital *Bibby Stuart Platform Rocker STR6* (Stuart, Reino Unido) durante 2 horas, em gelo. De seguida adicionou-se 15 % (v/v) de H<sub>2</sub>O Milli-Q, e realizou-se nova agitação durante 25 minutos. As amostras foram agitadas em vortex e centrifugadas (*Mixtasel P-Selecta*) a 2000 rpm, à temperatura ambiente, durante 5 minutos para obter um sistema de duas fases: a fase inferior corresponde à fase orgânica e a fase superior à fase aquosa, onde se encontram os gangliósidos. A fase orgânica foi utilizada para a quantificação

e análise de fosfolípidos, por abordagem lipidômica. Recolheu-se a fase superior; à fase inferior foi adicionado 15 % (v/v) de H<sub>2</sub>O Milli-Q, sendo estes passos repetidos duas vezes. Juntaram-se todas as fases aquosas e realizou-se nova centrifugação a 2000 rpm, à temperatura ambiente, durante 5 minutos para precipitar possíveis restos de proteína.

A extração dos gangliósidos foi concluída após extração em fase sólida, de acordo com Fuller *et al.*<sup>153</sup>, recorrendo um sistema *Visiprep SPE Vacuum Manifold* (Supelco, Bellefonte, PA). Resumidamente, os cartuchos *HyperSep C18* (Thermo Scientific) foram ativados com 3 x 1 mL de CH<sub>3</sub>OH e 3 x 1 mL de H<sub>2</sub>O Milli-Q. Após adição da amostra, procedeu-se à lavagem com 3 x 1 mL de H<sub>2</sub>O. Os gangliósidos foram eluídos com 3 x 1 mL de CH<sub>3</sub>OH. De seguida, adicionou-se 1 µL de padrão interno PI 16:0/16:0 e o solvente foi completamente evaporado sob corrente de azoto, a uma temperatura de 30 °C num bloco de aquecimento (*Stuart Block Heater SBH200D/3*, Reino Unido).

## 2.6. Quantificação dos fosfolípidos da fase orgânica

De forma a determinar a quantidade total de fosfolípidos presente no extratino lipídico total de cada condição experimental, efetuou-se um ensaio de quantificação espectrofotométrica de fosfato de acordo com o método de Bartlett e Lewis<sup>154</sup>, com ligeiras modificações. Inicialmente, redissolveu-se a fase orgânica de cérebro, seca em corrente de azoto, em 300 µL de clorofórmio. Seguiu-se a transferência de 5 µL de amostra para tubos de vidro; o ensaio foi realizado em duplicado. A cada tudo foi adicionado 125 µL de ácido perclórico (70 %), seguido de incubação durante 1 hora a 180 °C num bloco de aquecimento (*Stuart Block Heater SBH200D/3*, Reino Unido), seguido de arrefecimento à temperatura ambiente. Simultaneamente, foram preparados padrões de fosfato com concentração variável de 0 a 2 µg de fósforo, a partir de uma solução padrão de hidrogenofosfato de sódio dihidratado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O) com 100 µg/mL de fósforo. De seguida adicionou-se 825 µL de H<sub>2</sub>O Milli-Q, 125 µL de molibdato de sódio (2,5 %, m/v) e 125 µL de ácido ascórbico (10 %, m/v) às amostras e padrões, com agitação vigorosa após a adição de cada solução. Os tubos foram incubados durante 10 minutos num banho de água (*Precistern P-Selecta*) a ferver (95-100 °C) e, posteriormente, foram arrefecidos num banho de água gelada. Por fim, a leitura de absorvância a 797 nm é realizada numa microplaca de 96 poços, com auxílio de um leitor de microplacas (*Thermo Scintific Multiskan Go*).

## 2.7. Cromatografia líquida de alta performance acoplada a espectrometria de massa (HPLC-MS)

A técnica de HPLC-MS permite a identificação dos gangliósidos e quantificação dos mesmos, confirmando a sua presença e variações observadas no espectro. Para a análise dos gangliósidos utilizou-se como padrão interno uma PI (14:0/14:0). Os fosfolípidos usados como padrão interno das análises de fosfolípidos foram PC (14:0/14:0), LPC (19:0), PI (16:0/16:0), PE (14:0/14:0), PG (14:0/14:0), PS (14:0/14:0).

### 2.7.1. Análise por HPLC-MS da fase aquosa

Os gangliósidos, obtidos a partir da fase aquosa do homogeneizado de cérebro, foram separados por Cromatografia líquida de Interação Hidrofóbica (HILIC-LC-MS) usando o sistema HPLC *Thermo Accela*, com um injetor automático, acoplado *on-line* a um Espetrômetro de Massa Q Exactive Orbitrap (Thermo, Alemanha). Ao extratino aquoso seco obtido após fracionamento com SPE, foi adicionado 60 µL de eluente B (60 % ACN + 40 % CH<sub>3</sub>OH com 1 mM de acetato de amônio) e 1 µL de padrão PI (0,05 µg). A mistura foi introduzida numa coluna de sílica Ascentis Si HPLC Pore (15 cm × 1.0 mm, 3 µm; Sigma–Aldrich). No injetor automático as amostras foram mantidas a 10 °C. O fluxo de eluente na coluna foi 40 µL minutos<sup>-1</sup>; a temperatura da coluna foi de 30 °C. O gradiente do solvente foi programado da seguinte maneira: o gradiente começou com 0 % de A (10 % água e 55 % acetonitrilo com 35 % CH<sub>3</sub>OH (v/v)) e permaneceu igual durante 8 minutos. Aumentou linearmente até aos 60 % de A durante 7 minutos e permaneceu igual durante 22 minutos, retomando à condição inicial em 3 minutos.

O espetrômetro de massa Q Exactive Orbitrap encontrava-se equipado com uma fonte de ionização de *eletrospray* aquecida e foi operado no modo negativo. As condições usadas na HESI foram: voltagem do *spray* -2,7 kV; fluxo de gás auxiliar 20 unidades; temperatura do capilar 250 °C, potencial RF das lentes S, nível 50; temperatura de aquecimento 100 °C. A calibração do instrumento massa foi realizada a cada 7 dias, de forma a garantir uma precisão de massa menor do que 5 ppm.

Os dados de MS e MS/MS foram adquiridos utilizando um método dependente dos dados top 10. As experiências em full-scan foram adquiridas num analisador de massa Orbitrap numa gama de *m/z* 200-1600 com resolução 70000; valor alvo de 1E06; e 3 microscans. Os 10 iões mais intensos foram sucessivamente fragmentados numa célula de colisões HCD., utilizando energias de colisão 25, 30 e 35 eV. O espectro de massa tandem

foi adquirido com uma resolução de 17500; valor alvo de 5E04; 1 microscan e janela de isolamento de 1  $m/z$ . O *threshold* de seleção do ião foi de 1E04 contagens. O máximo de tempo de acumulação de iões foi de 713 ms para os espectros de MS s e 50 ms para o espectro de massa tandem. A exclusão dinâmica foi definida como 60 segundos. O controle e processamento dos dados foi efetuada no software Xcalibur (versão 3.3) da Thermo Fisher Scientific (USA).

### 2.7.2. Análise por HPLC-MS da fase orgânica

Os fosfolípidos foram separados por HILIC-LC-MS usando o Sistema HPLC *Thermo Accela*, com um injetor automático, acoplado *on-line* a um Espetrômetro de Massa Thermo High Resolution Q Exactive Orbitrap (Thermo, Alemanha). Uma alíquota de 5  $\mu\text{L}$  de amostra orgânica (correspondente a 5  $\mu\text{g}$  de extratino de fosfolípidos) foi misturada com 0,5  $\mu\text{L}$  da mistura de padrões de fosfolípidos, e adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de eluente B (60 % ACN + 40 %  $\text{CH}_3\text{OH}$  com 1 mM de acetato de amônio). A mistura foi introduzida numa coluna de sílica Ascentis Si HPLC Pore (15 cm  $\times$  1.0 mm, 3  $\mu\text{m}$ ; Sigma–Aldrich). No injetor automático as amostras foram mantidas a 10 °C. O fluxo de eluente na coluna foi 40  $\mu\text{L}$  minutos<sup>-1</sup>; a temperatura da coluna foi de 30 °C. O gradiente do solvente foi programado da seguinte maneira: o gradiente começou com 0 % de A (10 % água e 55 % acetonitrilo com 35 %  $\text{CH}_3\text{OH}$  (v/v)) e permaneceu igual durante 8 minutos. Aumentou linearmente até aos 60 % de A durante 7 minutos e permaneceu igual durante 22 minutos, retomando à condição inicial em 3 minutos.

Na análise dos fosfolípidos, a partir da fase orgânica do homogeneizado de cérebro, o Espetrômetro de Massa Q Exactive Orbitrap com uma fonte de ionização HESI adquiriu em modo positivo e negativo. As condições usadas na HESI foram: voltagem do *spray* 3 kV e 2,7 kV, no modo positivo e negativo, respetivamente; fluxo de gás auxiliar 20 unidades; temperatura do capilar 250 °C, potencial RF das lentes S, nível 50; temperatura de aquecimento 100 °C. A calibração da massa foi realizada a cada 7 dias, de forma a garantir uma precisão de massa menos do que 5 ppm.

Os dados de MS foram adquiridos utilizando um método dependente dos dados top 10. As experiências em full-scan foram adquiridas num analisador de massa Orbitrap numa gama de  $m/z$  200-1600 com resolução 70000; valor alvo de 1E06; e 2 microscans. Os 10 iões mais intensos foram fragmentados numa célula de colisões HCD. Para os passos de energia de colisão foram usados 25, 30 e 35 eV. O espectro de massa tandem foi adquirido com uma

resolução de 17500; valor alvo de 1E05; 1 microscan e janela de isolamento de 1  $m/z$ . O *threshold* de seleção do ião foi de 2E04 contagens. O máximo de tempo de acumulação de iões foi de 100 ms para Full MS scans e 50 ms para o espectro de massa tandem. A exclusão dinâmica foi definida como 60 segundos. O controlo e processamento dos dados foi efetuada no software Xcalibur (versão 3.3) da Thermo Fisher Scientific (USA).

Os dados de HPLC-MS foram processados e integrados no *software* MZmine 2<sup>155</sup>, com tolerância de 10 ppm de erro da massa exata, após identificação dos lípidos com base no cálculo da sua massa monoisotópica teórica e posterior análise do espectro de MS/MS. Para a análise dos gangliósidos nenhuma normalização foi realizada. Para a análise dos fosfolípidos foi realizada a normalização em relação com o padrão interno da classe correspondente.

## **2.8. Análise estatística**

Os resultados experimentais apresentam-se em termos de Média  $\pm$  Desvio padrão e foram analisados utilizando análise de variância multivariada (MANOVA) e análise de variância com um fator (ANOVA) usado para determinar as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os gangliósidos e entre as classes de fosfolípidos para cada grupo experimental. As análises estatística e discriminante foram determinadas com auxílio do programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*, versão 24.0 para Windows. Armonk, Nova Iorque).

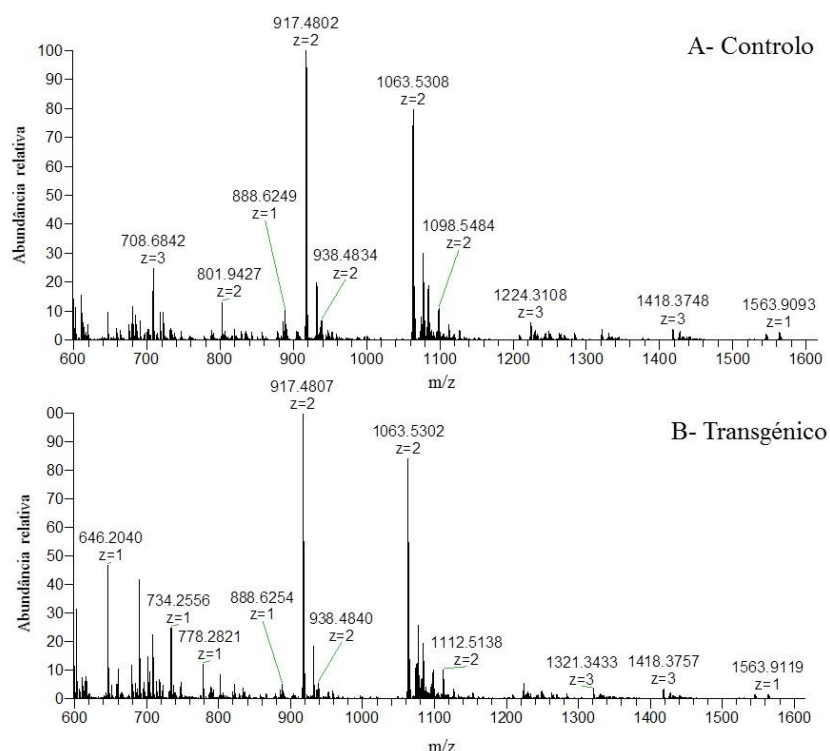


## **Capítulo 3 – Resultados**



### 3.1. Alteração do perfil de gangliósidos no cérebro de ratinhos transgênicos com doença de Alzheimer por HPLC-MS

A doença de Alzheimer apresenta perturbações ao nível da homeostasia dos lípidos<sup>21</sup>, tendo já sido observadas algumas diferenças na composição e concentração de gangliósidos. De forma a avaliar o efeito da doença de Alzheimer no perfil deste tipo de lípidos, os gangliósidos presentes no extratino aquoso de cérebro de ratinho foram analisados por HPLC-ESI-MS, no modo negativo (**Figura 6**). Os diferentes gangliósidos foram analisados por espectrometria de massa tandem (MS/MS). Na **Tabela 1** encontram-se os iões detetados por ESI-MS dos gangliósidos presentes no extratino aquoso, seguido da massa exata e experimental, e o erro da massa. Devido à presença de, pelo menos, um ácido siálico, estas moléculas ionizam facilmente no modo negativo formando iões de carga unitária  $[M-H]^{-156}$ , de carga dupla<sup>137</sup>  $[M-2H]^{2-}$ , de carga tripla<sup>157</sup>  $[M-3H]^{3-}$ , e com aductos de sódio<sup>157</sup>  $[M+Na-3H]^{2-}$ ,  $[M+2Na-4H]^{2-}$ ,  $[M+3Na-5H]^{2-}$ . É notável a presença de diferentes tipos de iões moleculares, providenciando a presença de um grande número de diferentes glicofomas e uma grande diversidade de ceram.



**Figura 6** – Espectro de HPLC-MS do extratino aquoso de cérebro de ratinho obtido em modo negativo, entre  $m/z$  600-1600, de cérebro controlo (A) e transgênico com doença de Alzheimer (B).

**Tabela 1** – Composição de gangliósidos no extratino de uma mistura de gangliósidos de cérebro de ratinho controlo (n=5) e ratinho transgénico para a doença de Alzheimer (n=4), detetado em modo negative por HILIC-ESI-MS. Identidade determinada por medida de massa exata.

Abreviatura	Tipo de ião	m/z exato	m/z experimental	Erro /ppm
9-O-acetil GT1b (d18:1/16:0))	[M-2H] <sup>2-</sup>	1070,0234	1070,0340	9,9
9-O-acetil GT1b (d18:1/18:0))	[M-2H] <sup>2-</sup>	1084,0391	1084,0331	-5,5
9-O-acetil-GT1b (d18:1/20:0))	[M-2H] <sup>2-</sup>	1098,0547	1098,0484	-5,7
9-OAc-NeuAcα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-4(NeuAcα2-3)Galβ1-4Glcβ-Cer (d18:1/16:0)	[M-2H] <sup>2-</sup>	924,4757	924,4857	10,8
9-OAc-NeuAcα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-4(NeuAcα2-3)Galβ1-4Glcβ-Cer (d18:1/18:0)	[M-2H] <sup>2-</sup>	949,4862	949,4810	-5,5
9-OAc-NeuAcα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-4(NeuAcα2-3)Galβ1-4Glcβ-Cer (d18:1/20:0)	[M-2H] <sup>2-</sup>	952,5070	952,5004	-6,9
GalNAc-GD1a (d18:1/18:0)	[M-2H] <sup>2-</sup>	1019,0258	1019,0185	-7,2
GalNAc-GD1a (d18:1/20:0)	[M-2H] <sup>2-</sup>	1033,0414	1033,0350	-6,2
GalNAc-GD1a (NeuAc/Neu5Gc) (d18:1/20:0) #	[M+3Na-5H] <sup>2-</sup>	1074,0235	1074,0168	-6,2
GalNAc-GD1a (NeuAc/Neu5Gc) (d18:1/22:0) #	[M-3Na-5H] <sup>2-</sup>	1088,0392	1088,0392	0,0
Galα1-3Galα1-3Galβ1-3GalNAcβ1-4(NeuAcα2-8NeuAcα2-3)Galβ1-4Glcβ-Cer (d18:1/16:0)	[M-2H] <sup>2-</sup>	1065,5232	1065,5360	12,0
GD1 (d18:1/18:0)	[M-2H] <sup>2-</sup>	917,4861	917,4795	-7,2
GD1 (d18:1/20:0)	[M-2H] <sup>2-</sup>	931,5017	931,4950	-7,2
GD1 (d18:1/22:0)	[M-2H] <sup>2-</sup>	945,5174	945,5105	-7,3
GD1a (d18:1/18:0) (NeuAc/NeuGc) #	[M-2H] <sup>2-</sup>	925,4835	925,4817	-1,9
GD1a (d18:1/22:0) (NeuGc/NeuGc) #	[M+Na-3H] <sup>2-</sup>	972,5071	972,4952	-12,2
GD3 (d18:1/18:0)	[M-2H] <sup>2-</sup>	734,9200	734,914	-9,5
GD3 (d18:1/20:0)	[M-2H] <sup>2-</sup>	748,9356	748,9289	-8,9

GD3 (d18:1/24:1)	[M-2H] <sup>2-</sup>	775,9591	775,9520	-9,1
GM1 (d18:1/16:0)	[M-H] <sup>1-</sup>	1517,8354	1517,8384	2,0
GM1 (d18:1/18:0)	[M-2H] <sup>2-</sup>	771,9384	771,9291	-12,0
GM1 (d18:1/18:0)	[M-H] <sup>1-</sup>	1544,8767	1544,8722	-6,0
GM1 (d18:1/20:0)	[M-H] <sup>1-</sup>	1572,9080	1572,8995	-5,4
GM2 (d18:1/18:0)	[M-H] <sup>1-</sup>	1382,8238	1382,8138	-7,2
GM3 (d18:1/18:0)	[M-H] <sup>1-</sup>	1179,7445	1179,7375	-5,9
GQ1 (d18:1/16:0) #	[M-3Na-5H] <sup>2-</sup>	1227,5505	1227,5487	-1,5
GQ1 (d18:1/18:0)	[M-2H] <sup>2-</sup>	1208,5815	1208,5747	-5,6
GQ1 (d18:1/20:0)	[M-2H] <sup>2-</sup>	1222,5971	1222,5896	-6,1
GT1 (d18:1/16:0)	[M-2H] <sup>2-</sup>	1049,0181	1049,0100	-7,7
GT1 (d18:1/18:0)	[M-3H] <sup>3-</sup>	708,3558	708,3489	-9,7
GT1 (d18:1/18:0)	[M-2H] <sup>2-</sup>	1063,0338	1063,0275	-5,9
GT1 (d18:1/20:0)	[M-3H] <sup>3-</sup>	717,6996	717,6927	-9,6
GT1 (d18:1/20:0)	[M-2H] <sup>2-</sup>	1077,0494	1077,0427	-6,2
GT1 (d18:1/22:0)	[M-2H] <sup>2-</sup>	1091,0651	1091,0560	-8,3
GT1 (d18:1/22:0)	[M-3H] <sup>3-</sup>	727,0434	727,0363	-9,8
GT1b (d18:1/18:0) #	[M-2H] <sup>2-</sup>	1071,0312	1071,0300	-1,1
NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3(Galα1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6)Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-Cer (d18:1/18:0) #	[M-3Na-5H] <sup>2-</sup>	1251,0816	1251,0863	3,8
NeuGcα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4Glcβ-Cer (d18:1/20:0) #	[M+2Na-4H] <sup>2-</sup>	815,9571	815,9576	0,6

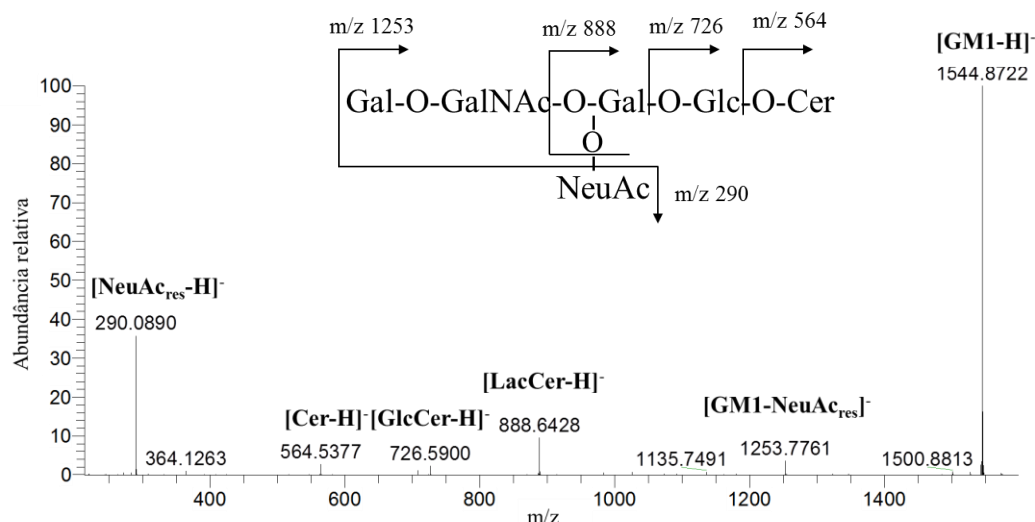
# Identidade teórica (não confirmado por MS/MS)

Das 38 espécies de gangliósidos encontradas, 8 estruturas foram identificadas como gangliósidos com 1 ácido siálico (GM), 16 estruturas como gangliósido com 2 ácidos siálicos (GD) e 11 estruturas como gangliósidos com 3 ácidos siálicos. Foram ainda identificadas espécies correspondentes a gangliósidos acetilados. A presença de espécies com modificações periféricas como *O*-acetilação é um facto reportado na literatura como uma das modificações covalentes mais comuns nos gangliósidos<sup>78</sup>. Apesar de ser uma modificação estrutural pequena, tem um grande impacto nas propriedades fisiológicas dos gangliósidos. A acetilação de ácidos siálicos promove a proteção contra a degradação por sialidases, está associada a tecidos numa fase de desenvolvimento avançado, e está ligada à progressão e propagação tumoral<sup>78,79</sup>.

Para caracterizar os detalhes estruturais e reconfirmar a identidade dos gangliósidos, recorreu-se à espectrometria de massa tandem de ionização por *electrospray* (ESI-MS/MS). Nas **Figura 7**, **Figura 8**, **Figura 9** e **Figura 10** é possível observar o espetro de MS/MS dos gangliósidos GM1 d18:1/18:0 ( $m/z$  1544,8722), GD3 d18:1/18:0 ( $m/z$  734,9140), GT1 d18:1/16:0 ( $m/z$  1049,0100) e 9O-acetil-GT1b d18:1/18:0 ( $m/z$  1084,0331), respetivamente, representando um exemplo de gangliósidos com 1, 2 e 3 ácidos siálicos e ainda de um gangliósido acetilado. Em cada um dos espetros é possível observar a formação característica do ião  $[\text{NeuAc}_{\text{res}}-\text{H}]^-$  ( $m/z$  290) correspondente à perda do ácido siálico. Todos os gangliósidos identificados têm uma base esfingóide composta por 18 carbonos e 1 insaturação. A quantidade de cargas que o gangliósido pode acomodar tem um impacto bastante significativo nas vias de fragmentação observadas<sup>158</sup>. Os gangliósidos com mais do que um ácido siálico têm maior facilidade para formar iões dupla  $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$  ou triplamente carregados  $[\text{M}-3\text{H}]^{3-}$ . Como exemplo, o GM1 ( $m/z$  1544,8722) possui apenas 1 ácido siálico, favorecendo a formação de espécies desprotonadas  $[\text{M}-\text{H}]^-$ . Ainda assim, é possível encontrar no espetro MS, o GM1 duplamente desprotonado ( $m/z$  771,9384), mas com uma abundância relativa baixa. Quando observados os espetros MS/MS, uma das diferenças nas vias de fragmentação está na abundância relativa dos iões. No caso dos iões monocarregados a abundância relativa máxima é do ião  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , quando comparada com os iões duplamente carregados, em que o ião da perda do ácido siálico é o ião mais abundante  $[\text{NeuAc}_{\text{res}}-\text{H}]^-$ .

O espetro MS/MS no modo negativo do GM1 18:0 está apresentado na **Figura 7**. O ião molecular desprotonado ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ) foi observado a  $m/z$  1544,8722. Os iões

correspondentes à fragmentação do GM1 estão sumariados na **Tabela 2** com a indicação dos valores de  $m/z$  teórica e experimental, a fórmula, e o erro associado à massa.

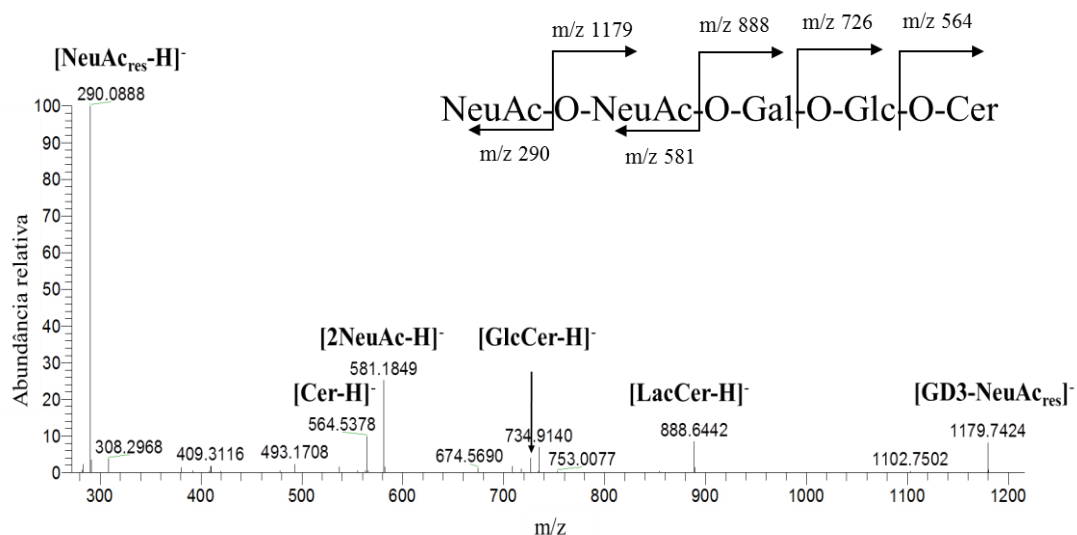


**Figura 7** - Espectro de MS/MS do ião  $[M-H]^-$  GM1 d18:1/18:0,  $m/z$  1544,8722 e as suas vias de fragmentação

**Tabela 2** – Principais iões produto observados no espectro de ESI-MS/MS do ião  $[GM1-H]^-$ , com a indicação da fórmula prevista, massa teórica e experimental e erro de massa medida.

	Fórmula	$m/z$ teórico	$m/z$ experimental	erro / ppm
$[GM1-H]^-$	$C_{73}H_{130}N_3O_{31}$	1544,8694	1544,8722	1,8
$[GM1-NeuAc_{res}]^-$	$C_{62}H_{113}N_2O_{23}$	1253,7734	1253,7761	2,2
$[LacCer-H]^-$	$C_{48}H_{90}NO_{13}$	888,6412	888,6428	1,8
$[GlcCer-H]^-$	$C_{42}H_{80}NO_8$	726,5884	726,5900	2,2
$[Cer-H]^-$	$C_{36}H_{70}NO_3$	564,5356	564,5377	3,7
$[NeuAc_{res}-H]^-$	$C_{11}H_{16}NO_8$	290,0879	290,0890	3,7

O espectro de MS/MS do ião  $[M-2H]^{2-}$  de  $m/z$  734,9140, GD3 18:0 está apresentado na **Figura 8**. Como este gangliósido possui 2 ácidos siálicos, tem a possibilidade de acomodar 2 cargas negativas, reduzindo para metade a sua razão massa/ carga. Os iões correspondentes à fragmentação do GD3 estão sumariados na **Tabela 3** com a indicação dos valores de  $m/z$  teórica e experimental, a fórmula, e o erro associado à massa.



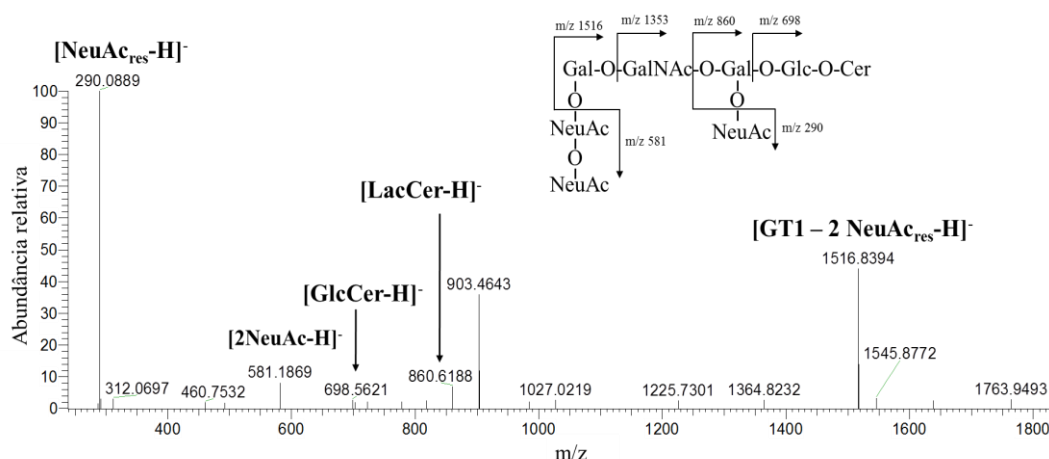
**Figura 8** - Espectro de MS/MS do ião  $[M-2H]^{2-}$  GD3 d18:1/18:0,  $m/z$  734,9130 e as suas vias de fragmentação.

**Tabela 3** – Principais iões produto observados no espectro de ESI-MS/MS do ião  $[GD3-2H]^{2-}$ , com a indicação da fórmula prevista, massa teórica e experimental e erro de massa medida.

	Fórmula	$m/z$ teórico	$m/z$ experimental	erro / ppm
$[GD3-2H]^{2-}$	$C_{70}H_{123}N_3O_{29}$	734,9121	734,9140	2,6
$[GD3-NeuAc_{res}]^-$	$C_{59}H_{107}N_2O_{21}$	1179,7366	1179,7424	4,9
$[LacCer-H]^-$	$C_{48}H_{90}NO_{13}$	888,6412	888,6442	3,4
$[GlcCer-H]^-$	$C_{42}H_{80}NO_8$	726,5884	726,5889	0,7
$[2NeuAc-H]^-$	$C_{22}H_{33}N_2O_{16}$	581,1841	581,1849	1,4
$[Cer-H]^-$	$C_{36}H_{70}NO_3$	564,5356	564,5378	3,9
$[NeuAc_{res}-H]^-$	$C_{11}H_{16}NO_8$	290,0879	290,0888	3,0

O espectro de MS/MS do ião  $[M-2H]^{2-}$  de  $m/z$  1049,0100, GT1 16:0 está apresentado na **Figura 9**. Este ião foi identificado com 2 e 3 cargas negativas, sendo o ião  $[M-2H]^{2-}$  o mais abundante. Os iões correspondentes à fragmentação do GT1 estão sumariados na **Tabela 4** com a indicação dos valores de  $m/z$  teórica e experimental, a fórmula, e o erro associado à massa.



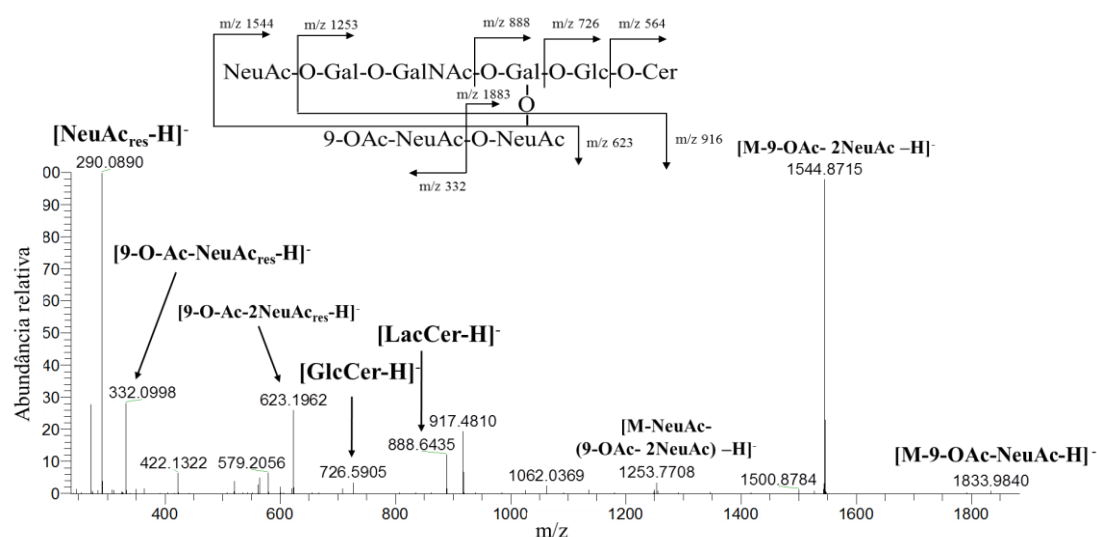


**Figura 9** - Espectro de MS/MS do ião  $[M-2H]^{2-}$  GT1 d18:1/16:0,  $m/z$  1071,0300 e as suas vias de fragmentação

**Tabela 4** - Principais iões produto observados no espectro de ESI-MS/MS do ião  $[GT1-2H]^{2-}$ , com a indicação da fórmula prevista, massa teórica e experimental e erro de massa medida.

	Fórmula	$m/z$ teórico	$m/z$ experimental	erro / ppm
$[GT1-2H]^{2-}$	$C_{93}H_{160}N_5O_{47}$	1049,0181	1049,0124	-5,4
$[GT1-2NeuAc_{res}]^-$	$C_{71}H_{125}N_3O_{31}$	1516,8302	1516,8394	6,1
$[LacCer-H]^-$	$C_{46}H_{86}NO_{13}$	860,6099	860,6188	10,3
$[GlcCer-H]^-$	$C_{40}H_{76}NO_8$	698,5571	698,5621	7,2
$[2NeuAc-H]^-$	$C_{22}H_{33}N_2O_{16}$	581,1841	581,1896	9,5
$[NeuAc_{res}-H]^-$	$C_{11}H_{16}NO_8$	290,0879	290,0889	3,3

O espectro de MS/MS do ião  $[M-2H]^{2-}$  de  $m/z$  1084,0331, 9-O-acetil GT1b 18:0 está apresentado na **Figura 10**. O ião correspondente ao ácido siálico ( $m/z$  290,0890), assim como o ião correspondente à perda do grupo  $[M-(9-O-Ac-NeuAc-NeuAc)-H]^-$  são iões mais abundantes ( $m/z$  1544,8715). É possível observar o ião correspondente ao ácido siálico acetilado ( $m/z$  332) confirmando a presença deste ácido acetilado. Os iões correspondentes à fragmentação do 9-O-acetil GT1b 18:0 estão sumariados na **Tabela 5** com a indicação dos valores de  $m/z$  teórica e experimental, a fórmula, e o erro associado à massa.



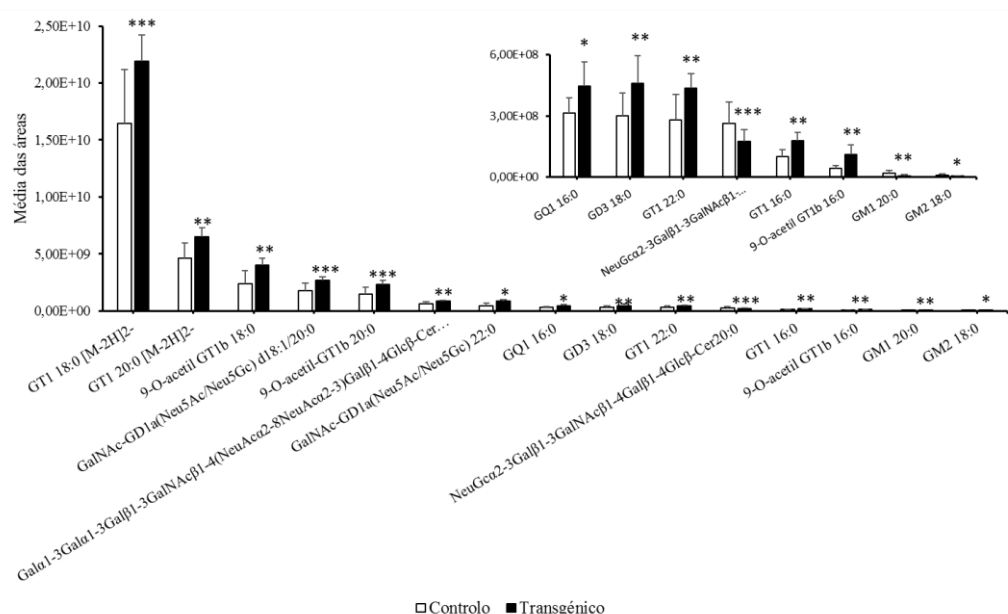
**Figura 10** - Espetro de MS/MS do ião  $[M-2H]^{2-}$  9-O-acetil GT1b d18:1/18:0,  $m/z$  1084,0331 e as suas vias de fragmentação.

**Tabela 5** - Principais iões produto observados no espectro de ESI-MS/MS do ião  $[9O\text{-Acetil-GT1b-}2H]^{2-}$ , com a indicação da fórmula prevista, massa teórica e experimental e erro de massa medida.

	Fórmula	$m/z$ teórico	$m/z$ experimental	erro / ppm
$[M-9O\text{-Ac-NeuAc}_{res}]^-$	$C_{84}H_{145}N_4O_{39}$	1833,9570	1833,9840	14,7
$[M-9O\text{-Ac-}2\text{NeuAc}_{res}]^-$	$C_{73}H_{130}N_3O_{31}$	1544,8616	1544,8715	6,4
$[M\text{-NeuAc}_{res}\text{-(}9O\text{-Ac-}2\text{NeuAc}_{res})]^-$	$C_{62}H_{113}N_2O_{23}$	1253,7656	1253,7708	4,1
$[LacCer\text{-H}]^-$	$C_{48}H_{90}NO_{13}$	888,6412	888,6435	2,6
$[GlcCer\text{-H}]^-$	$C_{42}H_{80}NO_8$	726,5884	726,5905	2,9
$[9O\text{-Ac-}2\text{NeuAc-H}]^-$	$C_{24}H_{35}N_2O_{17}$	623,1936	623,1962	4,2
$[9O\text{-Ac-NeuAc-H}]^-$	$C_{13}H_{18}NO_9$	332,0982	332,0998	4,8
$[NeuAc_{res}\text{-H}]^-$	$C_{11}H_{16}NO_8$	290,0879	290,0890	3,7

Após a identificação das diferentes espécies moleculares de gangliósidos, procedeu-se à quantificação relativa dos iões, tendo em conta a área do seu pico no cromatograma. A análise descritiva encontra-se apresentada na **Tabela 6** indicando os valores médios das abundâncias relativas obtidos para a composição de gangliósidos extraídos da fase aquosa do homogeneizado do cérebro de ratinho controlo e transgénico. As duas condições apresentam padrões quantitativos e qualitativos semelhantes de gangliósidos. Ambas contêm grandes quantidades de gangliósidos com 2 e 3 ácidos siálicos e gangliósidos acetilados, ou seja, gangliósidos mais complexos. Na **Figura 11** estão representadas todas as espécies de gangliósidos significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). É possível observar que as espécies que apresentam apenas um ácido siálico, como GM1, GM2 e NeuGc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ -Cer apresentam uma diminuição

da abundância relativa no grupo transgênico. Por outro lado, há um aumento visível da maioria das espécies GT1, que possuem 3 ácidos siálicos.



**Figura 11** - Conteúdo de gangliósidos, estatisticamente significativas, no extratino de cérebro de ratinho controle e transgênico analisado por HPLC-MS em modo negativo. Diferenças significativas do controle: \*p < 0,05, \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001.

**Tabela 6** - Composição de gangliósidos extraídos de cérebro de ratinho controle e transgênico para a doença de Alzheimer.

Identidade	m/z	Abundância relativa	
		Controle	Transgênico
9-O-acetil GT1b (d18:1/16:0)	1070,0340	4,17E+07 ± 1,29E+07	1,10E+08 ± 4,82E+07***
9-O-acetil GT1b (d18:1/18:0)	1084,0331	2,39E+07 ± 1,16E+09	4,04E+09 ± 5,64E+08**
9-O-acetil-GT1b (d18:1/20:0)	1098,0484	1,46E+09 ± 6,01E+08	2,28E+09 ± 3,75E+08**
9-OAc-NeuAcα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-4(NeuAcα2-3)Galβ1-4Glcβ-Cer (d18:1/16:0)	924,4857	7,04E+07 ± 3,33E+07	7,47E+07 ± 1,55E+07
9-OAc-NeuAcα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-4(NeuAcα2-3)Galβ1-4Glcβ-Cer (d18:1/18:0)	949,4810	7,38E+07 ± 3,21E+07	5,44E+07 ± 1,16E+07
9-OAc-NeuAcα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-4(NeuAcα2-3)Galβ1-4Glcβ-Cer (d18:1/20:0)	952,5004	4,74E+08 ± 3,22E+08	5,75E+08 ± 1,83E+08
Galα1-3Galα1-3Galβ1-3GalNAcβ1-4(NeuAcα2-8NeuAcα2-3)Galβ1-4Glcβ-Cer (d18:1/16:0)	1065,5360	5,98E+08 ± 1,73E+08	8,68E+08 ± 6,94E+07***
GalNAc-GD1a (d18:1/18:0)	1019,0185	1,65E+08 ± 6,70E+07	2,02E+08 ± 1,44E+07
GalNAc-GD1a (d18:1/20:0)	1033,0350	1,40E+07 ± 1,19E+07	8,56E+06 ± 7,03E+06

GalNAc-GD1a(NeuAc/Neu5Gc) (d18:1/22:0)	1088,0392	4,47E+08 ± 1,97E+08	8,44E+08 ± 1,33E+08***
GalNAc-GD1a(NeuAc/Neu5Gc) d18:1/(d18:1/20:0)	1074,0168	1,78E+09 ± 6,60E+08	2,66E+09 ± 3,07E+08
GD1 (d18:1/18:0)	917,4795	1,98E+10 ± 1,09E+10	2,63E+10 ± 5,05E+09
GD1a (d18:1/18:0) (NeuAc/NeuGc)	925,4817	7,33E+07 ± 4,04E+07	8,28E+07 ± 2,79E+07
GD1 (d18:1/20:0)	931,4950	3,53E+09 ± 2,67E+09	3,47E+09 ± 1,77E+09
GD1 (d18:1/22:0)	945,5105	7,67E+07 ± 3,24E+07	7,12E+07 ± 1,27E+07
GD1a (d18:1/22:0) (NeuGc/NeuGc)	972,4952	7,37E+07 ± 4,88E+07	5,75E+07 ± 4,73E+07
GD3 (d18:1/18:0)	734,9140	3,01E+08 ± 1,13E+08	4,62E+08 ± 1,35E+08*
GD3 (d18:1/20:0)	748,9289	2,82E+07 ± 2,12E+07	3,07E+07 ± 2,00E+07
GD3 (d18:1/24:1)	775,9520	1,51E+06 ± 1,67E+06	1,25E+06 ± 1,01E+06
GM1 (d18:1/16:0)	1517,8384	2,02E+06 ± 1,33E+06	9,80E+05 ± 1,07E+06
GM1 (d18:1/18:0)[M-H] <sup>-</sup>	1544,8722	4,59E+08 ± 2,05E+08	3,49E+08 ± 9,68E+07
GM1 (d18:1/18:0)[M-2H] <sup>2-</sup>	771,9291	5,03E+07 ± 1,90E+07	3,40E+07 ± 1,57E+07
GM1 (d18:1/20:0)	1572,8995	1,99E+07 ± 1,28E+07	6,04E+06 ± 6,87E+06*
GM2 (d18:1/18:0)	1382,8138	9,71E+06 ± 5,79E+06	2,52E+06 ± 2,35E+06**
GM3 (d18:1/18:0)	1179,7375	4,81E+07 ± 2,40E+07	3,33E+07 ± 1,10E+07
GQ1 (d18:1/16:0)	1227,5487	3,14E+08 ± 7,41E+07	4,48E+08 ± 1,19E+08**
GQ1 (d18:1/18:0)1208	1208,5747	3,48E+08 ± 9,50E+07	4,22E+08 ± 1,20E+08
GQ1 (d18:1/20:0)	1222,5896	1,26E+08 ± 4,37E+07	1,45E+08 ± 6,87E+07
GT1 (d18:1/16:0)	1049,0100	9,93E+07 ± 3,53E+07	1,79E+08 ± 3,92E+07***
GT1 (d18:1/18:0) [M-2H] <sup>2-</sup>	1063,0275	1,65E+10 ± 4,68E+09	2,19E+10 ± 2,31E+09**
GT1 (d18:1/18:0)[M-3H] <sup>3-</sup>	708,3489	4,57E+09 ± 1,60E+09	5,38E+09 ± 1,14E+09
GT1 (d18:1/20:0) [M-2H] <sup>2-</sup>	1077,0427	4,60E+09 ± 1,37E+09	6,49E+09 ± 7,73E+08**
GT1 (d18:1/20:0)[M-3H] <sup>3-</sup>	717,6927	1,32E+09 ± 4,08E+08	1,69E+09 ± 3,58E+08
GT1 (d18:1/22:0)	1091,0560	2,82E+08 ± 1,24E+08	4,38E+08 ± 7,16E+07**
GT1 22:0 [M-3H] <sup>3-</sup>	727,0363	8,77E+07 ± 4,90E+07	1,28E+08 ± 3,76E+07
GT1b (d18:1/18:0)	1071,0300	1,10E+08 ± 5,84E+07	1,26E+08 ± 1,02E+08
NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3(Galα1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6)Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-Cer (d18:1/18:0)	1251,0863	4,19E+08 ± 1,32E+08	3,16E+08 ± 1,18E+08
NeuGcα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4Glcβ-Cer(d18:1/20:0)	815,9576	2,65E+08 ± 1,05E+08	1,74E+08 ± 5,92E+07*

Diferenças significativas do controle: \*p< 0,05, \*\*p< 0,01 e \*\*\*p< 0,001. Resultados apresentados como Média ± Desvio padrão.

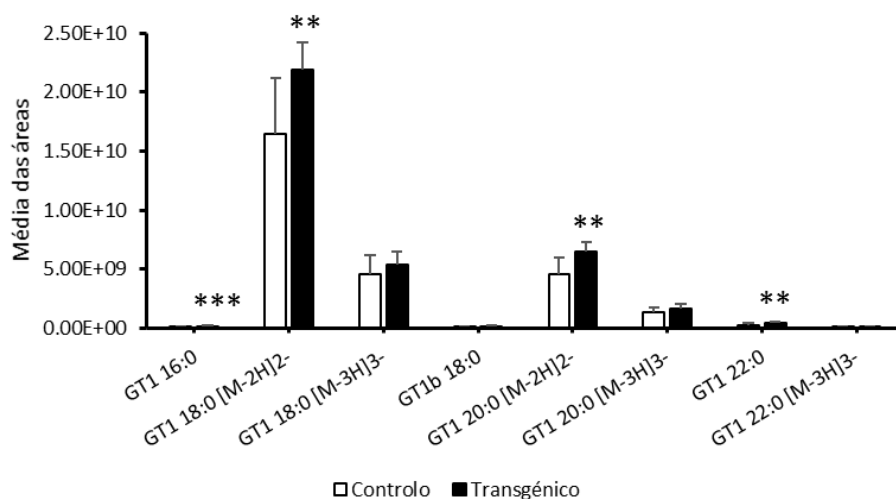
A variação dos diferentes gangliósidos no grupo transgénico em relação ao controlo foram testados realizando uma análise multivariada da variância (MANOVA). Esta análise (**Tabela 7**) permitiu concluir que no conjunto de amostras não se verificam diferenças com significado estatístico, em relação à análise de variância multivariada ( $p=0,434$ ). Apesar de globalmente não se verificar significado estatístico, quando realizamos análise multivariada das diferentes famílias, todas apresentam  $p < 0,05$ , exceto as espécies da família GM1 ( $p > 0,05$ ). Estes resultados permitiram-nos prosseguir na análise. A quantidade total de gangliósidos foi comparada entre o grupo controlo e o grupo transgénico utilizando uma análise de variância (ANOVA). Analisando as famílias com um maior número de espécies estatisticamente significantes: GT1 e gangliósidos com modificação covalentes 9-O-acetil-. A abundância relativa dos gangliósidos da família GT1 é a que apresenta um maior número de espécies com uma diferença significativa entre as condições experimentais. Os gangliósidos 9-O-acetil GT1b apresentam também diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 7** – Teste multivariado de comparação da composição de gangliósidos no grupo controlo e transgénico

Efeito	Valor	F	gl de hipótese	Sig.
Lambda de Wilks	0,021	2,908 <sup>a</sup>	16,00	0,434

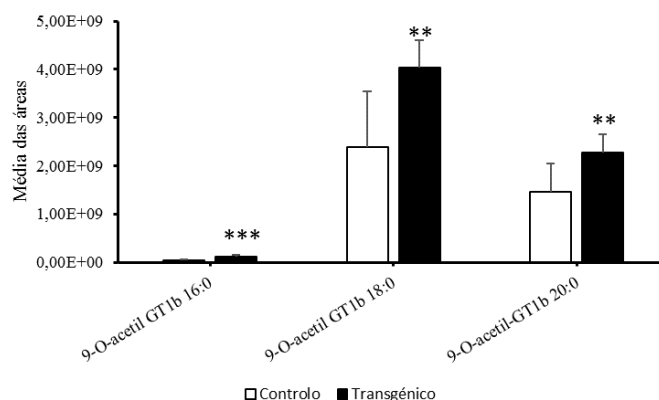
a. Estatística exata

Como é possível verificar na **Figura 12**, os gangliósidos da família GT1 apresentam diferentes abundâncias, sendo os gangliósidos GT1 18:0 [M-2H]<sup>2-</sup>, GT1 18:0 [M-3H]<sup>3-</sup> e GT1 20:0 [M-2H]<sup>2-</sup> que apresentam um aumento da sua abundância nos ratinhos transgénicos comparativamente ao controlo, sendo significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).



**Figura 12** - Diferença entre a média das áreas dos gangliósidos da família GT1. Média das áreas dos iões da família GT1 presentes no extratino aquoso do cérebro de ratinho controlo (a branco) e de ratinho transgénico (a preto). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  controlo versus transgénico.

Quanto aos gangliósidos *O*-acetilados, estes apresentam diferenças significativas ( $p < 0,005$ ) nos gangliósidos com 3 ácidos siálicos e com ácidos gordos 16:0, 18:0 e 20:0 (**Figura 13**), com um aumento destas espécies no grupo transgénico. Os gangliósidos da família 9-OAc-NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-4(NeuAc $\alpha$ 2-3)Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ -Cer não apresentam diferenças significativas entre os dois grupos de estudo. É possível verificarmos que há alterações destes gangliósidos com modificação quando apresentam 3 NeuAc na sua constituição, mas não quando apenas apresentam 2 NeuAc.



**Figura 13** - Diferença entre a média das áreas dos gangliósidos da família GT1b *O*-acetilados. Média das áreas dos iões da família GT1b *O*-acetilados presentes no extratino aquoso do cérebro de ratinho controlo (a branco) e de ratinho transgénico (a preto). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  controlo versus transgénico.

Foi realizada uma **análise discriminante** de forma a prever a separação entre os grupos controlo e o grupo transgénico. A variável de previsão é cada um dos gangliósidos identificados. Este tipo de estatística é utilizado para que sejam conhecidas as características que distinguem os membros de um grupo do outro, de forma a prever a que grupo pertencerá uma nova amostra. A **Tabela 8** indica a média de valores discriminantes para os sujeitos dos dois grupos. Os valores médios de cada grupo que se aproximam dos valores centróides com um valor negativo são discriminados como controlo e com um valor positivo como transgénico.

**Tabela 8** - Funções dos valores centróides discriminantes para valores médios dos grupos experimentais

<b>Grupo</b>	<b>Função 1</b>
Controlo	-5,752
Transgénico	7,191

Funções discriminantes canônicas não padronizadas avaliadas em médias de grupo

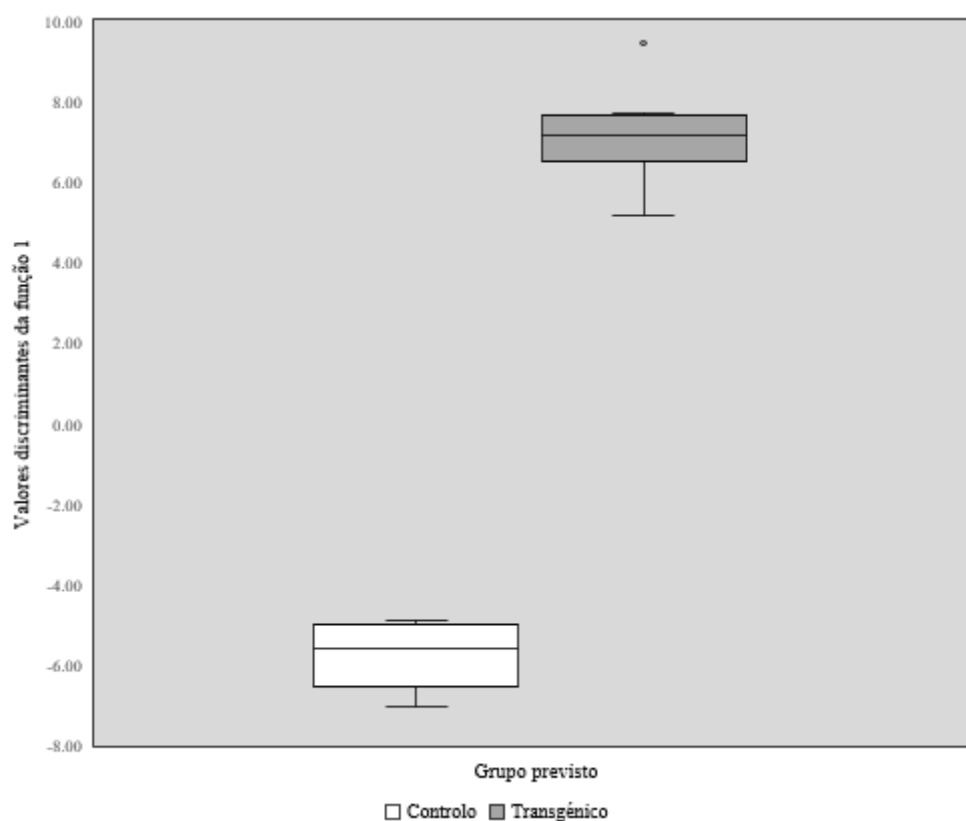
A **Tabela 9** mostra que o valor próprio associado a esta função é 46,534 e representa 100 % da variância explicada. O quadrado da correlação canónica  $(0,989)^2 = 0,98$ , indica que 98 % da variância na variável dependente, pertencer ao grupo controlo ou transgénico, é explicada por este modelo. Através do teste de  $\lambda$  de Wilks, podemos dizer que o teste é significativo ( $p = 0,014$ ), ou seja, as médias dos grupos são diferentes.

**Tabela 9** – Testes estatísticos de funções

<b>Teste de funções</b>	<b>1</b>
<b>Valores próprios</b>	
Valor próprio	46,534 <sup>a</sup>
Percentagem de variância	100
Percentagem cumulativa	100
Correlação canónica	0,989
<b><math>\lambda</math> de Wilks</b>	
$\lambda$ de Wilks	0,021
Qui-quadrado	30,984
Graus de liberdade	16
Significância	0,014

a. As primeiras 1 funções discriminantes canônicas foram usadas na análise.

As amostras são classificadas de acordo com os coeficientes da função discriminante canónica padronizada para cada variável. O gangliósido que permite a maior discriminação entre os grupos é o GM2 18:0, uma vez que esta variável de discriminação entre grupos é a mais diferente, seguindo-se o GM1 18:0 e o GT1 16:0 para discriminar o grupo controlo. As variáveis que permitem discriminar o grupo transgénico são GQ1 20:0, GQ1 16:0 e GT1 20:0. A natureza de discriminação para a função 1 foi identificada através de construção do gráfico de caixa de bigodes com os valores individuais de cada grupo. Os resultados obtidos mostram uma excelente percentagem de classificação dos grupos experimentais (100 % para cada grupo), com uma diferenciação clara entre o grupo controlo e transgénico ( $p < 0,05$ ), como é possível observar no diagrama da **Figura 14**.



**Figura 14** – Diagramas de caixa de bigodes que ilustra a distribuição de valores para os dois grupos controlo (n=5) e transgénico (n=4), de acordo com o conteúdo de gangliósidos.



### 3.2. Alteração do perfil de fosfolípidos da fase orgânica do cérebro de ratinhos transgênicos com doença de Alzheimer por HPLC-MS

A composição molecular específica de cada classe de fosfolípidos e de informação sobre a alteração no seu perfil foi realizada recorrendo a abordagem lipidômica por HILIC-LC-MS. Através da LC-MS foi possível separar e identificar 7 classes de fosfolípidos e 1 de glicosfingolípidos, no modo negativo: lisofosfatidilcolina (LPC), lisofosfatidiletanolamina (LPE), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidiletanolamina (PE) e sulfatido. De forma a assegurar a reprodutibilidade dos resultados, os dados foram obtidos de réplicas biológicas (n=5) e réplicas analíticas (n=2).

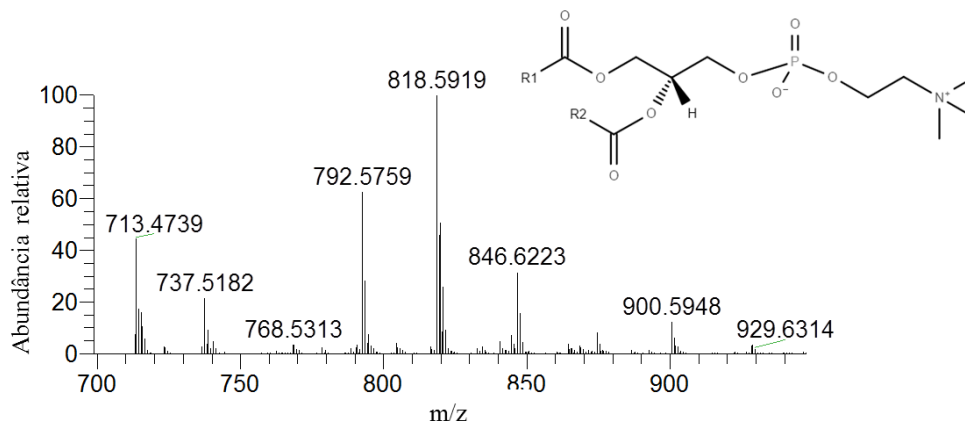
O efeito dos diferentes fosfolípidos no grupo transgênico, em relação ao controlo, foi testado usando MANOVA. As áreas dos picos observados nos cromatogramas de LC-MS de cada espécie molecular dos fosfolípidos refletem a sua abundância relativa, normalizadas de acordo com o padrão interno da sua classe. Esta análise (**Tabela 10**) permitiu concluir que no conjunto de amostras se verificam diferenças com significado estatístico em relação à análise de variância multivariada ( $p < 0,05$ ). Globalmente, podemos afirmar que os fosfolípidos permitem uma diferenciação entre os dois grupos experimentais. De forma a estudar quais os fosfolípidos que permitem esta separação, realizou-se o teste ANOVA. A abundância relativa dos glicolípidos sulfatido é a que apresenta um maior número de espécies com uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as condições experimentais. As classes de fosfolípidos PI, PG, PE também apresentam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os dois grupos.

**Tabela 10** - Teste multivariado de comparação da composição de fosfolípidos no grupo controlo e transgênico

Efeito	Valor	F	gl de hipótese	Sig.
Lambda de Wilks	0,000	411,173 <sup>a</sup>	28,00	0,039

a. Estatística exata

A classe de fosfolípidos PC representa a classe mais abundante das membranas biológicas, sendo a classe mais abundante nos extratinhos lipídicos totais analisados por HPLC-MS. Foram identificadas espécies diacil, liso- e alquenil. O espectro de MS obtido, em modo negativo, para o tempo de retenção desta classe ( $rt = 11$  a  $14$  minutos) encontra-se representado na **Figura 15**.



**Figura 15** – Espectro de HPLC-MS, adquirido a  $rt$  11 a 14 minutos, demonstrando a presença dos iões  $[M+CH_3COO]^-$  da classe PC (estrutura representada na figura), em modo negativo do extratino lipídico do cérebro controlo. O espectro encontra-se representado em termos de abundância relativa de cada ião em função do seu valor  $m/z$ .

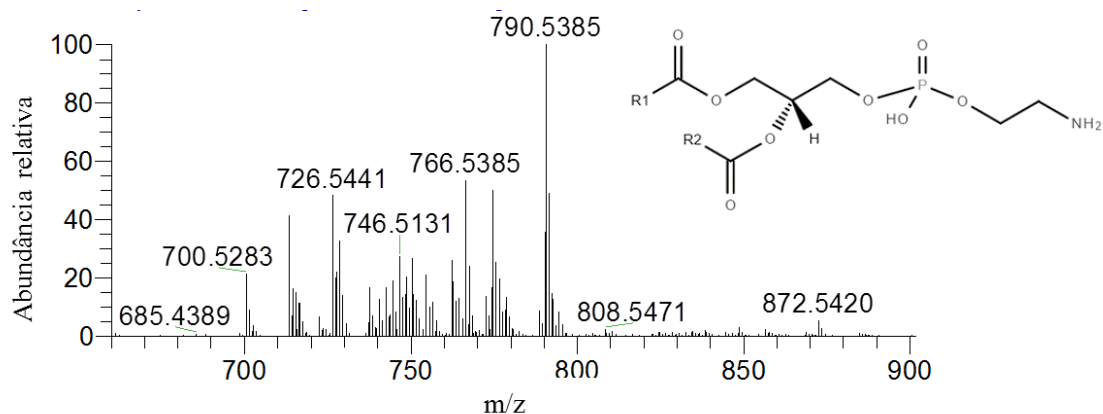
As espécies moleculares mais abundantes foram identificadas e analisadas quanto ao número de carbonos e insaturações presentes (**Tabela 11**). As espécies moleculares da classe PC que apresentam abundâncias relativas significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) são a PC 30:0, PC 32:1, PC 40:7 e LPC 18:1. Dado o elevado número de PC identificadas, e o número reduzido de diferenças significantes, podemos afirmar que as PC não permitem distinguir os dois grupos experimentais, uma vez que não há alterações acentuadas no perfil de espécies PC. Este facto está de acordo com o esperado, uma vez que as PC são a classe mais abundante das membranas das células<sup>100</sup>, estando presentes quer em condições fisiológicas, quer em condições patológicas, devido ao seu importante papel estrutural.

**Tabela 11** - Identificação dos  $[M+CH_3COO]^-$  observados no espectro de MS das PC. Os fosfolípidos são designados como: diacil 34:1 PC, onde 34 indica o número total de átomos de carbono nas posições *sn*-1 e *sn*-2 e 1 indica o número de ligações duplas nas duas posições.

Identidade		<i>m/z</i>	Abundância relativa	
			Controlo	Transgénico
Espécies diacil	PC.40:4	896,6381	2017,06±583,53	1837,37±719,85
	PC.28:0	736,5201	136,36±15,77	152,37±37,76
	PC.30:0	764,5452	1566,33±346,54	3612,19±1379,16***
	PC.32:1	790,5615	9218,7±2580,26	12065,4±4380,46*
	PC.34:0	820,6028	56792,92±17393,41	61583,05±26728,92
	PC.34:1	818,5919	279919,46±91098,85	291627,45±107128,17
	PC.36:1	846,6234	98518,94±31516,31	106876,39±36929,82
	PC.36:4	840,5751	27074,34±9058,14	27328±10728,41
	PC.38:2	872,6380	3943,69±1513,8	3444,54±1203,17
	PC.38:3	870,6159	4406,87±1071,24	5026,98±1851,43
	PC.38:4	868,6066	28036,7±6006,29	30590,4±11933,57
	PC.38:5	866,5883	10928,27±2292,29	8926,62±3116,73
	PC.38:6	864,5762	32567,78±6186,66	28525,81±11115,25
	PC.40:5	894,6161	3051,22±865,63	2646,37±889,14
	PC.40:6	892,6072	21473,34±5850,85	18897,85±6909,22
	PC.40:7	890,5922	959,72±363,74	715,1±270,41*
	PC.42:2	928,7040	638±134,29	572,89±215,2
Liso	LPC.18:0	582,3779	10,96±0,96	11,21±2,45
	LPC.18:1	580,3623	5,21±0,91	8,95±2,94***
Plasmalógico	PCp.34:0	804,6125	3401,34±895,37	4112,65±1423,77
	PCp.34:1	802,5965	885,18±350,98	941,82±313,28
	PCp.36:1	830,6279	707,04±207,51	764,9±222,1
	PCp.36:4	824,5787	2172,45±709,58	2393,27±821,12
	PCp.39:0	874,7076	1057,22±434,76	1077,63±374,78
	PCp.36:2	828,6129	289,88±116,76	365,76±136,86

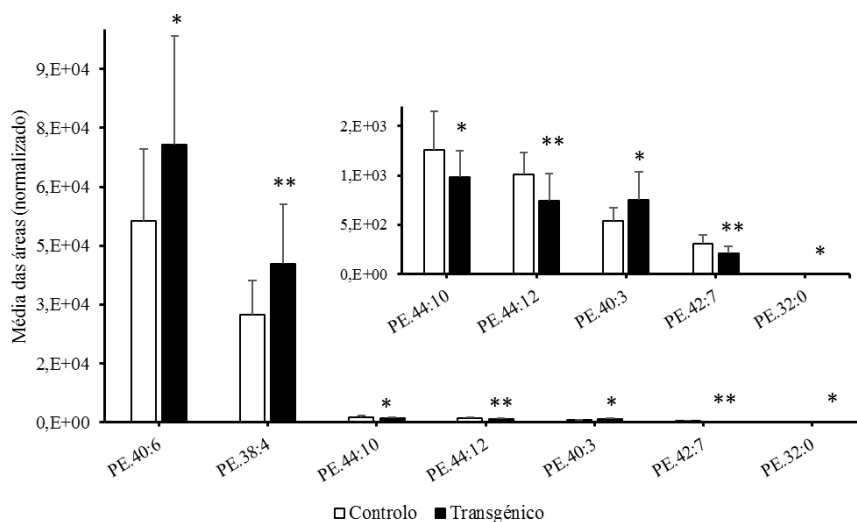
Todos os iões foram identificados como espécies com aductos de acetato  $[M+CH_3COO]^-$ . Diferenças significativas do controlo: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ . Resultados apresentados como Média ± Desvio padrão. # Identidade teórica (não confirmado pelo MS<sup>n</sup>).

A classe de fosfolípidos PE é uma das classes mais abundante das membranas biológicas, a seguir à PC. O espectro de MS obtido, em modo negativo,  $[M-H]^-$ , para o tempo de retenção desta classe ( $rt = 3-4$  minutos) encontra-se representado na **Figura 16**.



**Figura 16** - Espectro de HPLC-MS, adquirido a  $rt = 3-4$  minutos, demonstrando a presença dos iões  $[M-H]^-$  da classe PE (estrutura representada na figura), em modo negativo do extratino lipídico do cérebro controle. O espectro encontra-se representado em termos de abundância relativa de cada ião em função do seu valor  $m/z$ .

As espécies moleculares mais abundantes foram identificadas e analisadas quanto ao número de carbonos e insaturações presentes (**Tabela 12**). À semelhança da classe PC, foi possível a identificação de espécies diacil e alquenil. Na **Figura 17** encontram-se representadas as espécies da classe PE significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). É possível observar um aumento das espécies PE 32:0, PE 38:4, PE 40:3 e PE 40:6 no grupo transgénico, em relação ao controle. Curiosamente, há uma diminuição da quantidade das espécies PE 42:7, PE 44:10 e PE 44:12 no grupo transgénico, que são as espécies constituídas por ácidos gordos de maior número de carbonos e maior número de insaturações.



**Figura 17** – Conteúdo de espécies moleculares de PE, estatisticamente significativas, no extratino de cérebro de ratinho controlo e transgénico analisado por HPLC-MS em modo negativo. A identificação das espécies moleculares indicam o seu conteúdo C:N (número de carbono: número de insaturações). Diferenças significativas do controlo: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

**Tabela 12** - Identificação dos íons  $[M-H]^-$  observados no espectro de MS das PE. Os fosfolípidos são designados como: diacil 34:1 PE, onde 34 indica o número total de átomos de carbono nas posições *sn*-1 e *sn*-2 e 1 indica o número de ligações duplas nas duas posições.

Identidade		<i>m/z</i>	Abundância relativa	
			Controlo	Transgénico
Espécies diacil	PE.32:0	690,5058	3,46±1,1	4,8±1,62*
	PE.32:1	688,4913	0,88±0,26	1,1±0,4
	PE.34:0	718,5328	18,46±5,05	19,52±4,98
	PE.36:1	744,5545	11414,58±2527,48	12996,2±4168,95
	PE.38:1	772,5826	912,59±191,75	895,09±282,47
	PE.38:2	770,571	780,19±195,47	717,35±188,26
	PE.38:4	766,5385	27438,51±8736,99	40287,96±15352,48**
	PE.38:6	762,5078	18501,97±6259,22	24994,3±10884,45
	PE.40:3	796,5784	541,27±132,39	755,54±277,01*
	PE.40:4	794,5706	2702,84±725,75	3195,62±1573,4
	PE.40:6	790,5389	51374,58±18250,59	70698,94±27706,35*
	PE.40:7	788,5226	4442,28±1233,26	3790,23±1402,05
	PE.42:7	816,5545	310,46±83,78	212,33±69,87**
	PE.44:10	838,5387	1256±390,38	980,46±267,38*
	PE.44:12	834,5068	1011,3±218,87	743,35±277,44**
Liso	LPE .20:4	500,2787	5,33±1,96	17,16±4,63***
	LPE.22:6	524,2786	16,93±6,35	45,27±13,48***
Plasmalógico	PEp.34:1	700,5284	240,08±64,42	302,7±65,67*
	PEp.36:4	722,5128	66,13±22,04	90,44±31,40*
	PEp.38:4	750,5437	13224,06±4005,09	20278,55±7501,44**
	PEp.38:6	746,5131	14145,86±4307,7	21946,7±8635,15**
	PEp.40:4	778,5749	6737,32±1957,13	10500,91±3801,34**
	PEp.40:6	774,5438	27461,42±7462,5	39069,26±15553,81*
	PEp.42:4	806,6063	286,95±76,33	404,52±170,94*
	PEp.42:6	802,5746	431,44±115,35	636,22±222,19**

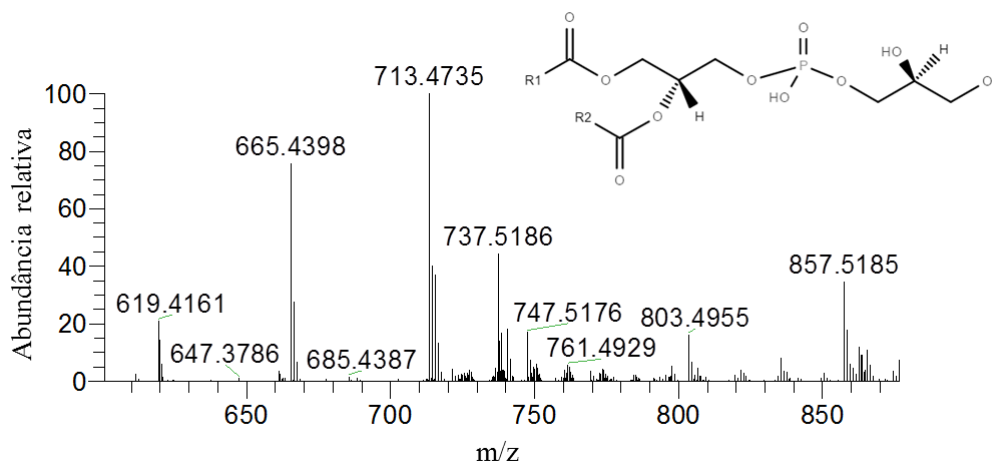
Todos os picos são  $[M-H]^-$ . Diferenças significativas do controlo: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

Resultados apresentados como Média ± Desvio padrão. # Identidade teórica (não confirmado pelo MS<sup>n</sup>).

Quanto à família das LPE, apesar de só terem sido detetadas duas espécies, LPE 20:4 e LPE 22:6, ambas apresentam um aumento significativo em relação ao controlo ( $p < 0,001$ ). O aumento significativo das espécies LPE no cérebro transgénico, evidência a importância dos lisofosfolípidos em situações de *stress*, possivelmente por associação a processos inflamatórios ou remodelação na síntese de fosfolípidos<sup>159</sup>.

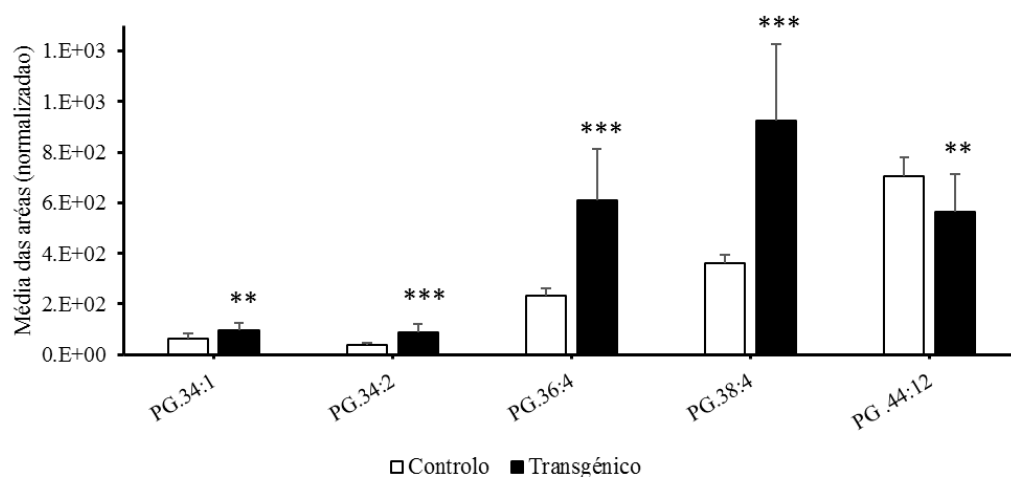
A maioria dos fosfolípidos na forma de plasmalogéneo presentes no cérebro pertencem à classe PE<sup>160</sup>. O conteúdo destas espécies encontra-se aumentado em relação ao grupo controlo em todas as espécies identificadas.

A classe de fosfolípidos PG é uma das classes menos abundante das membranas biológicas. O espectro de MS obtido, em modo negativo,  $[M-H]^-$ , para o tempo de retenção desta classe ( $rt = 2-3$  minutos) encontra-se representado na **Figura 18**.



**Figura 18** - Espectro de HPLC-MS, adquirido a  $rt = 2-3$  minutos, demonstrando a presença dos iões  $[M-H]^-$  da classe PG (estrutura representada na figura), em modo negativo do extratino lipídico do cérebro controlo. O espectro encontra-se representado em termos de abundância relativa de cada ião em função do seu valor  $m/z$ .

As espécies moleculares mais abundantes foram identificadas e analisadas quanto ao número de carbonos e insaturações presentes (**Tabela 13**). Na **Figura 19** encontram-se representadas as espécies da classe PG significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). De um modo geral, é possível observar um aumento significativo das espécies PG 34:1, PG 34:2, PG 36:4 e PG 38:4, exceto da PG 44:12 onde se verifica uma redução em relação ao controlo.



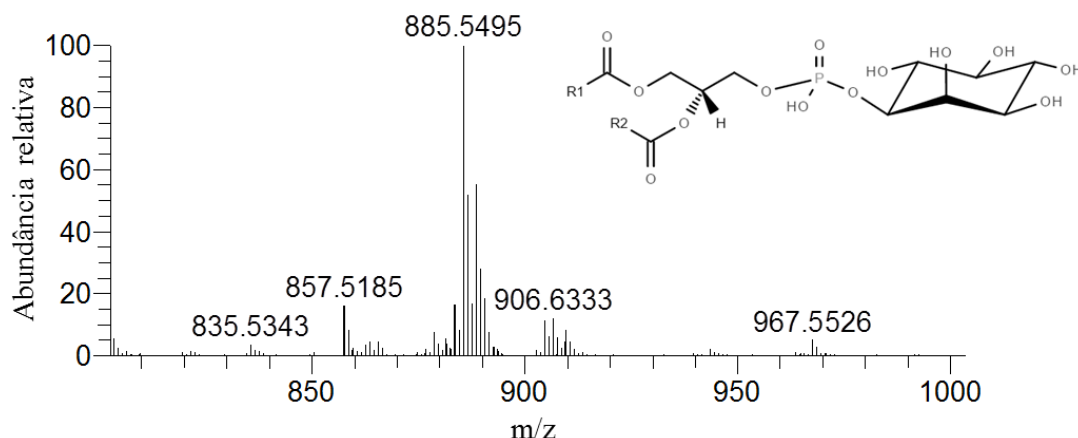
**Figura 19** - Conteúdo de espécies moleculares de PG, estatisticamente significativas, no extratino de cérebro de ratinho controlo e transgênico analisado por HPLC-MS em modo negativo. A identificação das espécies moleculares indicam o seu conteúdo C:N (número de carbono: número de insaturações). Diferenças significativas do controlo: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

**Tabela 13** - Identificação dos iões  $[M-H]^-$  observados no espectro de MS das PG. Os fosfolípidos são designados como: diacil 34:1 PG, onde 34 indica o número total de átomos de carbono nas posições *sn*-1 e *sn*-2 e 1 indica o número de ligações duplas nas duas posições.

Identidade	<i>m/z</i>	Abundância relativa	
		Controlo	Transgênico
PG.32:0	721,5022	5,11±0,64	5,24±1,14
PG.34:1	747,5175	64,45±17,48	94,19±29,54**
PG.34:2	745,5033	37,44±8,4	86,44±36,08***
PG.36:4	769,5021	233,06±28,24	610,15±200,63***
PG.38:4	797,5328	361,22±31,39	923,99±302,38***
PG.44:12	865,5021	704,29±74,71	565,66±145,8**

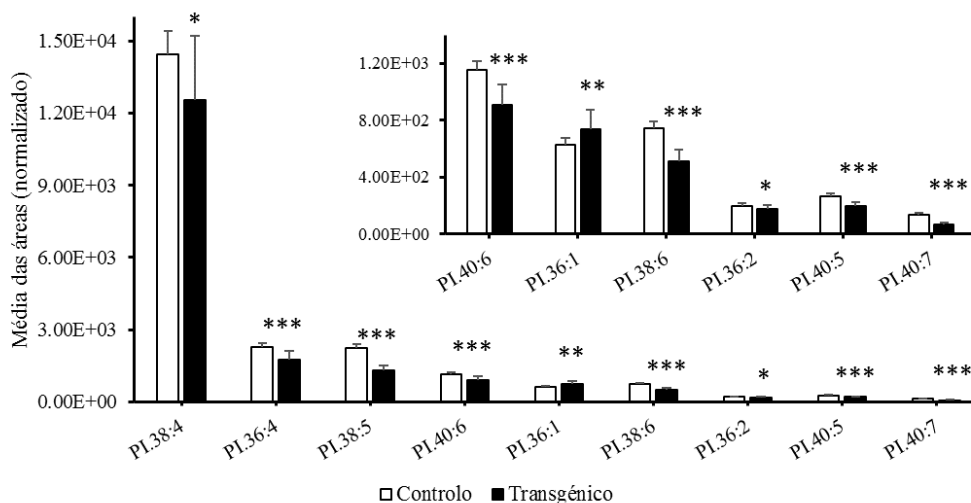
Todos os picos são  $[M-H]^-$ . Diferenças significativas do controlo: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ . Resultados apresentados como Média ± Desvio padrão. # Identidade teórica (não confirmado pelo MS<sup>n</sup>).

A classe de fosfolípidos PI representa uma das classes menos abundante das membranas biológicas, estando envolvida na sinalização celular<sup>105</sup>. O espectro de MS obtido, em modo negativo,  $[M-H]^-$ , para o tempo de retenção desta classe ( $r_t = 2-3$  minutos) encontra-se representado na **Figura 20**.



**Figura 20** - Espectro de HPLC-MS, adquirido a  $rt = 2-3$  minutos demonstrando a presença dos iões  $[M-H]^-$  da classe PI (estrutura representada na figura), em modo negativo do extratino lipídico do cérebro controle. O espectro encontra-se representado em termos de abundância relativa de cada ião em função do seu valor  $m/z$ .

As espécies moleculares mais abundantes foram identificadas e analisadas quanto ao número de carbonos e insaturações presentes (**Tabela 14**). Na **Figura 21** encontram-se representadas as espécies da classe PI significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). De um modo geral, é possível observar uma diminuição significativa das espécies da classe PI. Das 9 espécies identificadas, com significado estatístico, 8 apresentam diminuição da sua abundância relativa no grupo transgénico. Apenas a PI 36:1 apresenta um aumento em relação ao grupo controle.



**Figura 21** - Conteúdo de espécies moleculares de PI, estatisticamente significativas, no extratino de cérebro de ratinho controle e transgénico analisado por HPLC-MS em modo negativo. A identificação das espécies moleculares indicam o seu conteúdo C:N (número de carbono: número de insaturações). Diferenças significativas do controle: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

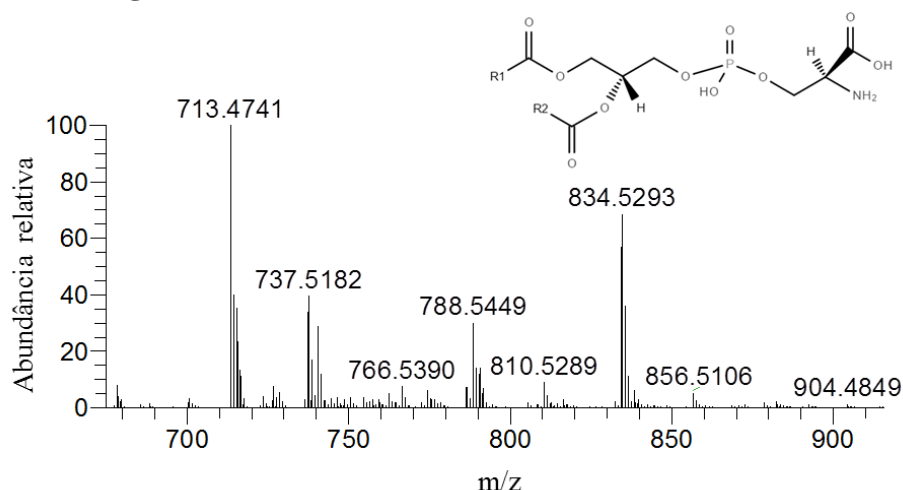


**Tabela 14** - Identificação dos iões  $[M-H]^-$  observados no espectro de MS das PI. Os fosfolípidos são designados como: diacil 34:1 PI, onde 34 indica o número total de átomos de carbono nas posições *sn*-1 e *sn*-2 e 1 indica o número de ligações duplas nas duas posições.

Identidade	<i>m/z</i>	Abundância relativa	
		Controlo	Transgénico
PI.34:0	837,5483	220,93±21,2	208,24±39,46
PI.34:1	835,5343	531,59±36,75	541,11±100,53
PI.34:2	833,5166	55,54±39,03	65,85±43,28
PI.36:1	863,5653	625,48±49,24	735,62±140,3**
PI.36:2	861,5493	195,88±21,73	173,84±27,42*
PI.36:4	857,5184	2268,41±158,16	1729,34±371,86***
PI.38:4	885,5495	14442,07±965,1	12537,18±2657,6*
PI.38:5	883,5337	2248,72±165,32	1283,76±234,87***
PI.38:6	881,5184	747,09±44,29	512,23±80,6***
PI.40:4	913,5803	140,42±9,51	141,16±21,1
PI.40:5	911,5590	265,91±16,76	198,22±27,1***
PI.40:6	909,5496	1157,28±56,99	906,7±142,74***
PI.40:7	907,5356	135,43±12,68	64,73±17,67***
PI.42:4	941,6419	6,77±4,09	7,52±5,82

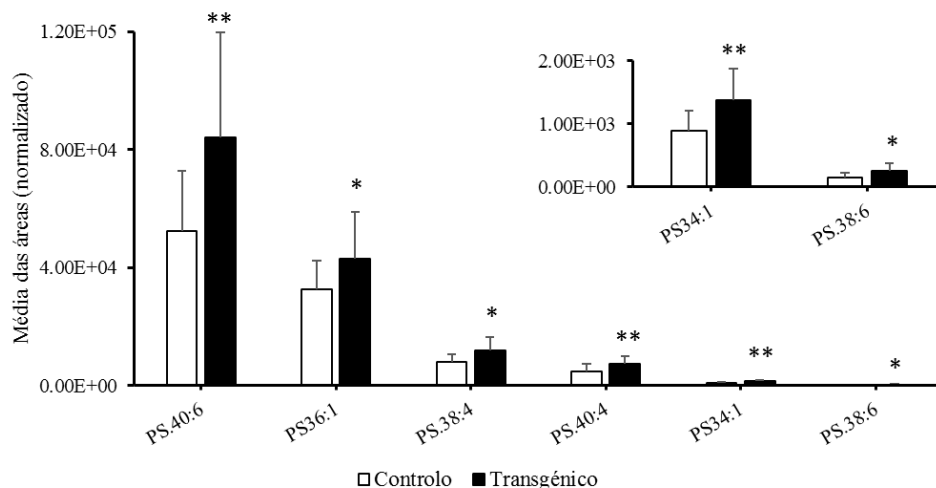
Todos os picos são  $[M-H]^-$ . Diferenças significativas do controlo: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Resultados apresentados como Média  $\pm$  Desvio padrão. # Identidade teórica (não confirmado pelo MS<sup>n</sup>).

A classe de fosfolípidos PS representa um dos componentes essenciais da membrana envolvida em importantes funções regulatórias<sup>114</sup>. O espectro de MS obtido, em modo negativo,  $[M-H]^-$ , para o tempo de retenção desta classe ( $rt = 6-7$  minutos) encontra-se representado na **Figura 22**.



**Figura 22** - Espectro de HPLC-MS, adquirido a  $rt$  6-7 minutos, demonstrando a presença dos iões  $[M-H]^-$  da classe PS (estrutura representada na figura), em modo negativo do extratino lipídico do cérebro controlo. O espectro encontra-se representado em termos de abundância relativa de cada ião em função do seu valor  $m/z$ .

As espécies moleculares mais abundantes foram identificadas e analisadas quanto ao número de carbonos e insaturações presentes (**Tabela 15**). Na **Figura 23** encontram-se representadas as espécies da classe PS significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Todas as espécies da classe PS apresentam um aumento da abundância em relação ao grupo transgênico.



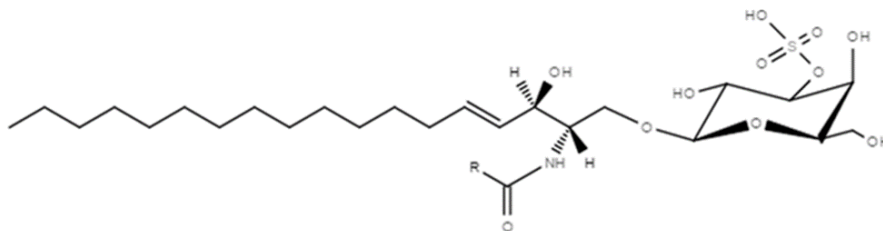
**Figura 23** - Conteúdo de espécies moleculares de PS, estatisticamente significativas, no extratino de cérebro de ratinho controle e transgênico analisado por HPLC-MS em modo negativo. A identificação das espécies moleculares indicam o seu conteúdo C:N (número de carbono: número de insaturações). Diferenças significativas do controle: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

**Tabela 15** - Identificação dos iões  $[M-H]^-$  observados no espectro de MS das PS. Os fosfolípidos são designados como: diacil 34:1 PS, onde 34 indica o número total de átomos de carbono nas posições *sn*-1 e *sn*-2 e 1 indica o número de ligações duplas nas duas posições.

Identidade	<i>m/z</i>	Abundância relativa	
		Controle	Transgênico
PS.28:0	678,4351	269,38±77,38	300,6±80,72
PS.38:4	810,5288	7966,62±2703,38	11816,99±4694,73*
PS.38:5	808,5119	757,53±245,13	976,76±372,94
PS.38:6	806,4982	148,93±77,31	249,96±128,68*
PS.40:4	838,5608	4877,1±2302,28	7377,74±2568,53**
PS.40:6	834,5293	52429,05±20355,62	84062,74±35755,84**
PS.40:7	832,5130	1358,71±409,27	1603,49±670,59
PS34:1	760,5133	892,47±313,83	1378,69±494,5**
PS36:1	788,5448	32439,73±9979,27	42931,37±15735,76*
PS36:2	786,5294	6883,08±3008,01	8668,53±3288,01
PS38:2	814,5608	1002,18±442,12	1272,42±399,79

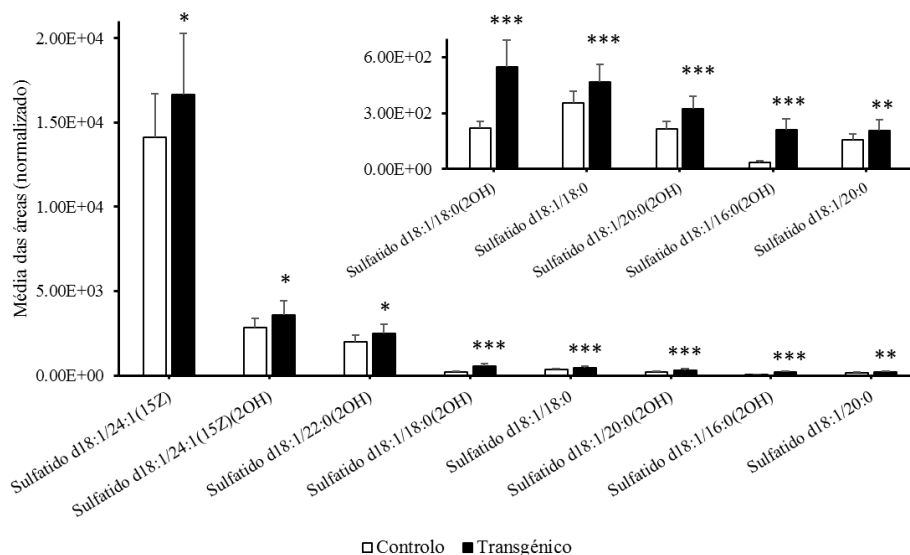
Todos os picos são  $[M-H]^-$ . Diferenças significativas do controle: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Resultados apresentados como Média ± Desvio padrão. # Identidade teórica (não confirmado pelo MS<sup>n</sup>).

Os sulfatidos (**Figura 24**) são ésteres de sulfato de galactocerebrosídeos, nos quais o grupo sulfato está localizado no carbono 3 do açúcar <sup>161</sup>. Este tipo de lípido pertence à família dos esfingolípídeos, tal como os gangliósidos. Os sulfatidos, ao contrário dos gangliósidos que têm um grande grupo de oligossacarídeos, possuem apenas um açúcar e um grupo sulfato na sua composição conferindo-lhe características mais apolares. Sendo assim, a sua identificação foi feita a partir da fase orgânica do extratino de cérebro de ratinho.



**Figura 24** – Estrutura molecular generalizada do sulfatido.

As espécies moleculares mais abundantes de sulfatidos foram identificadas e analisadas quanto à esfingosina e à cadeia de ácido gordo, de acordo com a massa teórica (**Tabela 16**). Na **Figura 25** encontram-se representadas as espécies dos sulfatidos significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Todas as espécies dos sulfatidos apresentam um aumento em relação ao grupo controlo.



**Figura 25** - Conteúdo de espécies moleculares de sulfatido, estatisticamente significativas, no extratino de cérebro de ratinho controlo e transgénico analisado por HPLC-MS em modo negativo. A identificação das espécies moleculares indica o número de carbonos e insaturações da esfingosina e do ácido gordo. Diferenças significativas do controlo: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

**Tabela 16** - Identificação dos iões  $[M-H]^-$  observados no espectro de MS dos sulfatido.

Identidade	$m/z$	Abundância relativa	
		Controlo	Transgénico
Sulfatido d15:0/26:1(17Z)	876,6233	627,43±125,09	667,1±153,07
Sulfatido d18:1/16:0(2OH)	794,507	34,85±9,49	209,93±59,31**
Sulfatido d18:1/18:0	806,545	352,92±63,26	468,41±91,22**
Sulfatido d18:1/18:0(2OH)	822,5443	220,39±36,34	548,18±142,29**
Sulfatido d18:1/20:0	834,5768	157,18±30,82	205,83±58,37**
Sulfatido d18:1/20:0(2OH)	850,5717	214,5±39,75	320,46±69,59**
Sulfatido d18:1/22:0	862,607	1028,6±201,58	1199,7±269,06
Sulfatido d18:1/22:0(2OH)	878,6024	2006,29±381,41	2471,51±564,41*
Sulfatido d18:1/24:0	890,6365	4912,33±897,36	5436,5±1254,43
Sulfatido d18:1/24:0(2OH)	906,6333	3070,35±576,21	3403,59±784,61
Sulfatido d18:1/24:1(15Z)	888,6239	14103,3±2600,43	16630,92±3642,14*
Sulfatido d18:1/24:1(15Z)(2OH)	904,6176	2858,45±531,68	3571,9±847,75*

Todos os picos são  $[M-H]^-$ . Diferenças significativas do controlo: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Resultados apresentados como Média  $\pm$  Desvio padrão. # Identidade teórica (não confirmado pelo MS<sup>n</sup>).

Foi realizada uma **análise discriminante** de forma a prever a separação entre os grupos controlo e o grupo transgénico, com base nos fosfolípidos. A **Tabela 17** indica a média de valores discriminantes para os sujeitos dos dois grupos. Os valores médios de cada grupo que se aproximam dos valores centróides com um valor negativo são discriminados como controlo e com um valor positivo como transgénico.

**Tabela 17** - Funções dos valores centróides discriminantes para valores médios dos grupos experimentais

Grupo	Função 1
Controlo	-13,992
Transgénico	13,992

Funções discriminantes canónicas não padronizadas  
avaliadas em médias de grupo

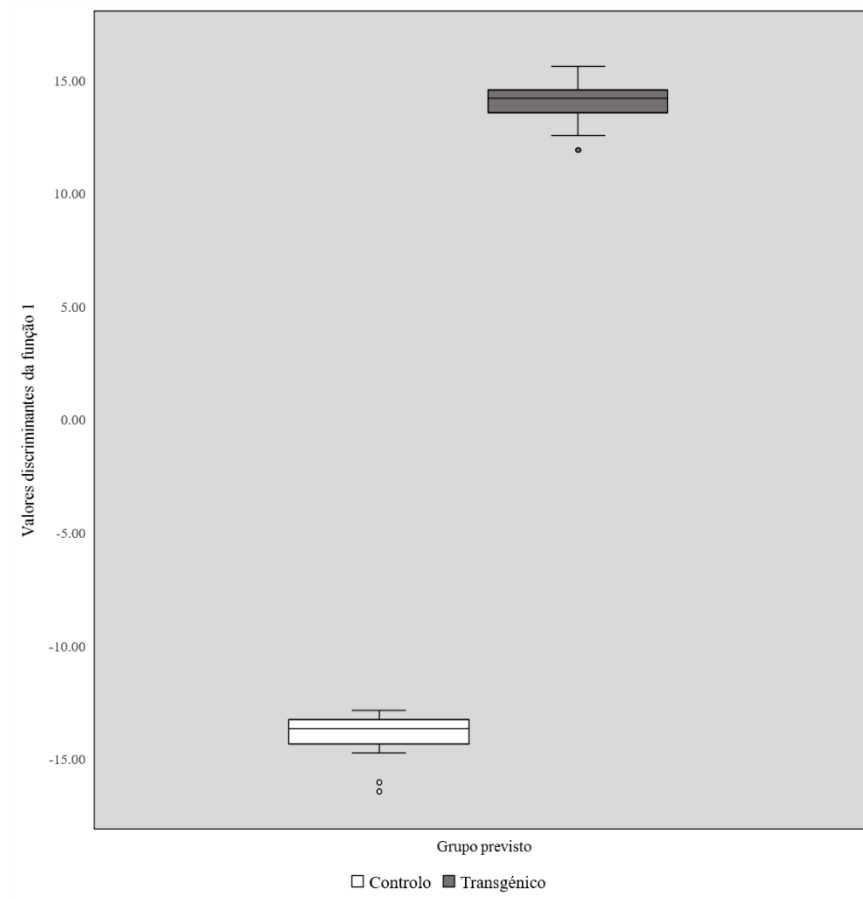
A **Tabela 18** mostra que o valor próprio associado a esta função é 211,323 e representa 100 % da variância explicada. O quadrado da correlação canónica  $(0,989)^2 = 0.98$ , indica que 98 % da variância na variável dependente, pertencer ao grupo controlo ou transgénico, é explicada por este modelo. Através do teste de  $\lambda$  de Wilks, podemos dizer que o teste é significativo ( $p < 0,001$ ), ou seja, as médias dos grupos são diferentes. Isto permite afirmar a possibilidade de diferenciar os dois grupos através dos fosfolípidos negativos presentes no extratino.

**Tabela 18** - Testes estatísticos de funções

Teste de funções	1
Valores próprios	
Valor próprio	211,323 <sup>a</sup>
Percentagem de variância	100
Percentagem cumulativa	100
Correlação canônica	0,989
$\lambda$ de Wilks	
$\lambda$ de Wilks	0,005
Qui-quadrado	90,963
Graus de liberdade	22
Significância	0,000

a. As primeiras 1 funções discriminantes canônicas foram usadas na análise.

As amostras são classificadas de acordo com os coeficientes da função discriminante canônicas padronizados para cada variável. Os fosfolípidos que permitem a maior discriminação entre os grupos são a PI 34:2, PI 40:5, PC 42:2 e LPE 20:4, uma vez que esta variável de discriminação entre grupos é a mais diferente. As variáveis que contribuem para discriminar o grupo controlo são a PE 44:10, PC 40:7, PS 40:4 e PS 38:6. A natureza de discriminação para a função 1 foi identificada através de construção do gráfico de caixa de bigodes com os valores individuais de cada grupo. Os resultados obtidos mostram uma excelente percentagem de classificação dos grupos experimentais (100 % para cada grupo), com uma diferenciação clara entre o grupo controlo e transgénico ( $p < 0,05$ ), como é possível observar no diagrama da **Figura 26**.



**Figura 26** - Diagramas de caixa de bigodes que ilustra a distribuição de valores para os dois grupos controlo (n=5) e transgénico (n=5), de acordo com o conteúdo de fosfolípidos.

## **Capítulo 4 – Discussão de resultados**





O ramo da neurolipidômica apresenta diversos desafios e está em constante evolução<sup>23,149</sup>. Um dos desafios passa pelo complexo metabolismo, homeostasia e função de lípidos. No entanto, recentes desenvolvimentos, particularmente em técnicas com recurso a MS, tornam possível a realização de estudos em tecidos específicos, em doenças e em classes de lípidos específicas. Estes desenvolvimentos permitem a identificação e quantificação de classes de lípidos que têm baixa massa molecular, como lisofosfolípidos, Cer, e de espécies moleculares com baixa abundância, como PS e cardiolipina<sup>162</sup>. O LC-ESI-MS é o método mais usado, permitindo a caracterização, identificação e quantificação dos lípidos, com grande sensibilidade e especificidade<sup>163</sup>. Assim, é evidente que o uso de técnicas acopladas a MS se tornaram essenciais para avaliar o lipidoma celular em diferentes perturbações fisiológicas.

Neste trabalho foram estudados os lípidos presentes nos extratos aquoso e orgânico de cérebros de ratinho da condição controlo e transgénico para a doença de Alzheimer. O uso de modelos transgénicos para a doença de Alzheimer é uma técnica promissora que facilita a compreensão dos mecanismos e causas da doença. Este modelo triplo transgénico 3xTG-AD possui as mutações APP *Swedish*, MAPT P301L e PSEN1 M146V, associadas a mutações que estão na origem da doença de Alzheimer familiar (ou *early-onset*)<sup>164</sup>. A mutação APP *Swedish* é um tipo de mutação na APP e está associada a mutações *missense* no gene que codifica esta proteína<sup>165</sup>. Esta mutação leva a um aumento da produção de A $\beta$ , através de uma mutação no N-terminal da  $\beta$ -secretase em vesículas secretórias. Assim, esta clivagem ocorre no mesmo compartimento que a clivagem por  $\alpha$ -secretase, que normalmente previne a produção de A $\beta$ , explicando o aumento de A $\beta$  causado a partir da competição entre a  $\alpha$ - e  $\beta$ - secretase. A mutação MAPT P301L, ocorre em regiões altamente conservadas da sequência da proteína tau. *In vitro*, esta mutação tem sido relacionada com a forte tendência para a formação e agregação de PHF<sup>166</sup>, que se relaciona com a sua propensão para formar estrutura em folha- $\beta$ <sup>167</sup>. A mutação PSEN1 M146V, estudada em células COS-1, altera a atividade da  $\gamma$ -secretase na clivagem de APP em péptidos A $\beta$ <sub>42</sub> e A $\beta$ <sub>40</sub>, resultando em altos níveis de A $\beta$ <sub>42</sub> e aumento do rácio A $\beta$ <sub>42</sub>/ A $\beta$ <sub>40</sub><sup>168</sup>. Esta mutação afeta também a atividade de canais dependentes de cálcio, estudado em células de neuroblastoma SK-N-SH, causando a sua inibição<sup>169</sup>.

Os principais tipos de lípidos detetados de forma semi-quantitativa foram os glicolípidos, nomeadamente os gangliósidos, a partir da fase aquosa de cérebro de ratinho

3xTg-AD, e os fosfolípidos e os glicolípidos, a partir da fase orgânica do cérebro de ratinho 3xTg-AD. Este estudo demonstrou que a presença de mutações que mimetizam a doença de Alzheimer humana, resulta em alterações a nível dos lípidos de membrana no cérebro de ratinho podendo estas alterações estar associadas às características neuropatológicas da doença. Ambas as classes lipídicas em estudo apresentaram diversas espécies com diferenças significativas de abundância relativa ( $p < 0,05$ ).

O estudo de gangliósidos no extratino aquoso de cérebros de ratinho da condição controlo e transgénico para a doença de Alzheimer permitiu detetar gangliósidos com um diferente número de açúcares neutros, de ácidos siálicos e Cer com diferentes cadeias carbonadas. Após a análise das espécies moleculares de gangliósidos foi possível observar uma diminuição da abundância relativa de espécies com apenas um ácido siálico na sua composição no grupo dos ratinhos transgénicos. Os gangliósidos complexos, como o GT1, GQ1, 9-O-acetil-GT1b encontram-se aumentados no grupo dos ratinhos transgénicos.

O GM1 e GM2 são gangliósidos simples, possuindo apenas 1 ácido siálico na sua composição. O GM1 está diminuído no grupo transgénico, uma vez que tem uma grande afinidade para o péptido  $A\beta^{64}$ . A ligação GM1- $A\beta$  favorece a conformação folha- $\beta$  do péptido, diminuindo a sua solubilidade e levando à formação de agregados fibrilares insolúveis em conformação folha- $\beta$ , podendo depositar na forma de placas senis<sup>14</sup>, que afetam a passagem de informação na fenda sináptica. Por outro lado, a diminuição de GM1 livre diminui a sua eficácia como neuroprotetor<sup>66</sup>, levando à neurodegeneração. A abundância relativa da espécie GM2 encontra-se diminuída no grupo dos ratinhos transgénicos. Barrier *et al.*<sup>170</sup> estudaram o córtex do cérebro de ratinhos transgénicos (PSEN1), onde os níveis de GM2 se encontravam diminuídos comparativamente ao controlo. No mesmo estudo, mas em ratinhos transgénicos para a APP, há um aumento deste gangliósido associado ao processo de envelhecimento, e consequentemente a demência. Por outro lado, a mutação PSEN1 causa perturbações no metabolismo dos gangliósidos, uma vez que afeta as reservas de cálcio, o tráfego e o *turnover* de proteínas<sup>171</sup>. Consequentemente, a mutação PSEN1 pode modificar a homeostasia de cálcio no retículo, perturbando os primeiros passos da biossíntese de gangliósidos, nomeadamente a formação de GM2 e GM3.

O gangliósido GD3 encontra-se aumentado no grupo transgénico. Este aumento já tinha sido observado no córtex frontal e parietal de cérebros de doentes de Alzheimer<sup>172</sup>. A acumulação deste gangliósido está associada à morte celular induzida pelo péptido  $A\beta^{72}$ ,

estudado *in vitro* em neurónios corticais de ratazana. Estas observações são consistentes com a função reguladora do GD3 na proliferação celular, processos de diferenciação e regulação da apoptose. A falta da enzima GD3 sintase, enzima responsável pela síntese de GD3, torna a célula resistente à morte celular<sup>59</sup>, apoiando o facto do GD3 ser importante na indução da morte celular.

Os gangliósidos da série GT1 (GT1 16:0, GT1 18:0, GT1 20:0, GT1 22:0) encontram-se aumentados no grupo transgénico. A espécie GT1 18:0 é a espécie mais abundante, quer no grupo controlo, quer no grupo transgénicos. A família GT1 têm maior dificuldade a acomodar o péptido A $\beta$  porque, ao possuir 3 ácidos siálicos, a interação com o péptido não é tão eficiente, deixando-o livre e iniciando a passagem para uma estrutura em folha- $\beta$ <sup>173</sup>. Durante o processo de envelhecimento, os níveis de GT1b aumentam. Através de resultados obtidos por estudos de RMN, foi sugerido que o GT1b é o gangliósido que mais favorece a conformação em folha- $\beta$  do péptido A $\beta$  (GT1b > GD1a > GD1b > GM1), favorecendo a conformação de placas senis<sup>173</sup>. Kracun *et al.*<sup>172</sup> reportaram a diminuição dos níveis de GT1b em diferentes regiões do cérebro de doentes de Alzheimer. Num estudo realizado em tecido do hipocampo de cérebro de modelo de ratinho duplo transgénicos PSEN1-APP não se verificaram alterações dos níveis de GT1b<sup>34</sup>.

O gangliósido GQ1, um dos gangliósidos mais complexos, apresenta um aumento da sua abundância relativamente ao controlo. Barrier *et al.*<sup>170</sup> estudaram ratinhos transgénicos (PSEN1), onde os níveis de GQ1b se encontravam aumentados comparativamente ao controlo. Um estudo realizado em ratinhos transgénicos induzidos com AP-1 e A $\beta$ <sub>42</sub> durante o envelhecimento reportou o aumento do GQ1ba<sup>77</sup>. Esta *upregulation* do GQ1ba pode servir como um mecanismo compensatório relacionado com o declínio da função colinérgica com a idade.

Os gangliósidos com a modificação covalente 9-*O*-acetil GT1b encontram-se elevados no grupo de ratinhos transgénicos. Anteriormente, diferentes trabalhos<sup>174,175</sup> já tinha reportado a existência desta família de gangliósidos no cérebro de ratinho. Poucos são os estudos relacionados com estes gangliósidos, uma vez que estão em baixas quantidades nos tecidos. Sabe-se que a acetilação de ácidos siálicos promove a proteção contra a degradação por sialidases e está associada a tecidos numa fase de desenvolvimento avançado<sup>79</sup>.

Numa análise global, é possível verificar que há uma grande quantidade de gangliósidos complexos, tanto no grupo controlo como no grupo dos transgénicos, uma vez que estas são

das espécies predominantes no cérebro<sup>44</sup>. Os níveis de gangliósidos com 3 ou mais ácidos siálicos aumentaram relativamente ao controlo. Este aumento dos níveis de sialilação, pelo aumento da abundância relativa destes gangliósidos complexos, promove a formação do complexo GM1-A $\beta$  altamente neurotóxico<sup>81</sup>. A ligação do péptido A $\beta$  é favorecido pela elevada quantidade de ácidos siálicos<sup>82</sup>.

A análise discriminativa (**Figura 14**) demonstra que a doença de Alzheimer induz alterações específicas na abundância relativa de espécies de gangliósidos em cérebro de ratinho transgénico. O gangliósido que permite a maior discriminação entre os grupos é o GM2 18:0, uma vez que esta variável de discriminação entre grupos é a mais diferente, seguindo-se o GM1 18:0 e o GT1 16:0 para discriminar o grupo controlo. As variáveis que permitem discriminar o grupo transgénico são os gangliósidos GQ1 20:0, GQ1 16:0 e GT1 20:0. Conforme discutido anteriormente, o GM1 é um dos gangliósidos mais abundantes no cérebro, tendo importantes propriedades fisiológicas como o envolvimento na plasticidade neuronal e mecanismos de reparação e neuroproteção<sup>66</sup>. Os gangliósidos mais complexos, com um elevado número de ácidos siálicos na sua composição, estão associados à discriminação do grupo de ratinhos transgénicos. A presença destes gangliósidos na superfície da célula favorece a ligação do péptido A $\beta$  ao GM1, formando um complexo altamente neurotóxico<sup>81</sup> e característico no cérebro de pacientes com doença de Alzheimer.

O estudo dos fosfolípidos e glicolípidos no extratino orgânico de cérebros de ratinho da condição controlo e transgénico para a doença de Alzheimer permitiu detetar diferentes classes como PC, LPC, PE, LPE, PEP, PG, PI, PS e sulfatido. A classe de fosfolípidos PC é a classe mais abundante dos fosfolípidos do cérebro, estando ligada à componente estrutural das membranas especializadas como a mielina e membranas sinápticas<sup>93</sup>. No nosso estudo não foi possível observar diferenças significativas desta classe de fosfolípidos entre ratinhos do grupo de controlo e os ratinhos transgénicos estudados. Este resultado está de acordo com alguns estudos publicados. Um estudo realizado por Prasad *et al.*<sup>100</sup> em cérebro de pacientes com doença de Alzheimer, verificou que os níveis de PC se encontravam inalteráveis entre os grupos controlo e com doença de Alzheimer. Os nossos resultados mostram que os níveis de LPC 18:1 encontravam-se aumentados no grupo transgénico. Este aumento pode ser explicado pelo aumento da atividade da fosfolipase A2, tendo alguns estudos reportado o aumento dos seus níveis na doença de Alzheimer<sup>176</sup>. De acordo com o estudo de Sheikh *et al.*<sup>177</sup>, que usa uma linha celular neuronal humana, o aumento dos níveis de LPC induzem a

formação dos péptidos A $\beta$ , e consequentemente, neurodegeneração. Por outro lado, o aumento dos níveis de LPC leva à destruição da mielina de cérebro de ratinhos adultos<sup>96</sup>.

No caso da classe PE, observamos diferenças mais acentuadas nas abundâncias relativas nos iões identificados nas duas condições estudadas. Efetivamente, no extratino de cérebro de ratinho transgénico, há um aumento de espécies como PE 32:0, PE 38:4, PE 40:3 e PE 40:6. Estes resultados não estão de acordo com o reportado num estudo anterior<sup>100</sup>, em que os autores verificaram, por TLC, uma diminuição dos níveis de PE totais, em diferentes regiões do cérebro de pacientes com doença de Alzheimer. Todavia, noutro estudo realizado em modelos de ratinho transgénico com mutação PSEN1 e modelos de ratinho transgénico com mutação na APP, estes apresentam níveis de PE totais aumentados<sup>110</sup>. As PEs são fosfolípidos envolvidos na ligação de proteínas à membrana, favorecida pelo pequeno tamanho da PE, o que aumenta a estabilidade da membrana<sup>84</sup>.

Quanto à família das LPE, foi observado um aumento das espécies LPE 20:4 e LPE 22:6 no grupo do ratinho triplo transgénico 3xTg-AD. Um estudo reporta que em modelos com uma mutação, em PSEN1 ou APP, os níveis de LPE diminuem<sup>110</sup>. No entanto, no mesmo estudo é utilizado um modelo de ratinho transgénico com duas mutações em PSEN1-APP, onde se verifica um aumento dos níveis de LPE, concordante com os nossos resultados. O aumento de LPE pode estar associado a um aumento da atividade da fosfolipase A2, que está envolvida na regulação dinâmica da substituição de ácidos gordos na posição *sn*-2 ou *sn*-1 da PE<sup>159</sup>. Se os ácidos gordos, 20:4 e 22:6, envolvidos na síntese de moléculas pró-inflamatórias, no caso de 20:4, e anti-inflamatórias no caso de 22:6, não se encontram livres, então poderá haver um agravamento da neuroinflamação associada à doença de Alzheimer, causando graves danos a nível celular. Estudos demonstraram que a doença de Alzheimer está associada à depleção de ácidos gordos polinsaturados como o 22:6 e o 20:4<sup>178,179</sup>, podendo ter um impacto direto na receção de químicos na densidade pós-sináptica<sup>105</sup>. Um estudo realizado em ratinhos transgénico APP-PSEN1, que foi alimentado com ácido gordo 22:6 ou óleo de peixe, revelou uma diminuição dos níveis de A $\beta$  no hipocampo<sup>180</sup>.

Quanto à família de PEp, também observamos um aumento significativo em todas as espécies identificadas PEp.34:1, PEp.36:4, PEp.38:4, PEp.38:6, PEp.40:4, PEp.40:6, PEp.42:4, PEp.42:6. Num estudo verificaram que, após análise de diferentes regiões de cérebro de pacientes com doença de Alzheimer esporádico, ocorreu um aumento das espécies PEp 36:4, PEp 36:3, PEp 36:2 e PEp 38:4<sup>110,181</sup>. No entanto, num modelo duplo

transgénico PSEN1-APP todas as espécies moleculares identificadas no nosso estudo encontram-se diminuídas em relação ao controlo, exceto a espécie PEp.38:6 que se encontra aumentada. Curiosamente, um estudo relacionou a redução da quantidade de PEp em eritrócitos com a severidade de demência, no entanto nem sempre é detetada na análise do cérebro de doentes de Alzheimer<sup>104</sup>. Pacientes com patologia tau e A $\beta$  pouco acentuadas mas com um baixo nível de PEp apresentam maior debilidade do que aqueles que possuem uma patologia primária exacerbada, mas pequenas alterações no perfil de PEp. Os PEp incorporam os ácidos gordos 20:4 na posição *sn*-2 ou 22:6 na posição *sn*-1 (revisto em 94). O aumento dos níveis de PEp pode estar associado a uma tentativa de resolução do *stress* oxidativo<sup>103</sup> associado à doença de Alzheimer<sup>182</sup>, uma vez que é um antioxidante natural devido à ligação éter vinílica na posição 1 e a presença de ácidos gordos polinsaturados como 20:4 e 22:6<sup>94</sup>.

A classe PG encontra-se aumentada significativamente no grupo transgénico, tendo sido identificadas as espécies PG 34:1, PG 34:2, PG 36:4 e PG 38:4. Apenas a espécie PG 44:12 apresenta uma redução em relação ao grupo controlo. Chan *et al.*<sup>110</sup> demonstraram por HPLC-MS em diversos modelos de ratinho transgénicos para a doença de Alzheimer, que o conteúdo de PG se encontrava diminuído em relação ao controlo. Um trabalho realizado para estudar a interação de A $\beta$ <sub>17-42</sub> com modelos de bicamadas neutras, compostas por PC, ou com modelos de bicamadas negativas, compostas por PC/PG, mostra que A $\beta$ <sub>17-42</sub> tem maior interação com as bicamadas negativas<sup>183</sup>. Estas observações são concordantes com o facto de as bicamadas compostas por lípidos aniónicos aumentarem a adsorção e fibrilação de A $\beta$ . Os íões de cálcio são importantes para formar pontes iónicas que associam os resíduos negativamente carregados de A $\beta$ <sub>17-42</sub> aos grupos aniónicos dos lípidos da bicamada. O aumento das pontes iónicas formadas pelo cálcio pode levar a desregulação na homeostasia de cálcio, resultando na disfunção e morte neuronal.

Neste estudo as espécies PI.36:2, PI.36:4, PI.38:4, PI.38:5, PI.38:6, PI.40:5, PI.40:6 e PI.40:7, pertencentes à classe PI, encontram-se significativamente diminuídas, com exceção da PI 36:1. A diminuição dos níveis de PI foi observada em outros estudos realizados em cérebro de pacientes com doença de Alzheimer<sup>100,110</sup>. Esta diminuição pode estar associada a uma diminuição dos níveis de biossíntese ou aumento dos níveis de degradação das PI<sup>100</sup>, para formação de intermediários de sinalização. Pettegrew *et al.*<sup>184</sup> demonstraram que os níveis de PI se correlacionam inversamente com o aumento dos níveis

de placas senis extracelulares e NFT intracelulares. A depleção da PI 36:4 e PI 38:6 antecipada pela perda de função da ApoE, associado à doença de Alzheimer esporádico, pode contribuir para acelerar o processo de sinaptotoxicidade dos péptidos A $\beta$ <sup>105</sup>.

Relativamente às PS, foram observadas espécies moleculares com abundâncias significativamente diferentes, como PS 34:1, PS 36:1, PS 38:4, PS 38:6, PS 40:4 e PS 40:6, encontrando-se aumentadas relativamente ao grupo controlo. A espécie molecular mais abundante identificada é a PS 40:6, o que está de acordo com estudos anteriores<sup>185</sup>. Estes resultados encontram-se de acordo com o reportado por Igbavboa *et al.*<sup>185</sup> em que num estudo em ratinhos deficientes em ApoE, reportou níveis aumentados PS. Estes autores constataram também a presença de PS com ácidos gordos 18:0 e 22:6, destacando a sua importância nos sinaptossomas, assim como de espécies moleculares insaturadas importantes para a fluidez presente nas membranas sinápticas. O aumento dos níveis de PS pode levar a uma quebra da ligação entre a membrana e a proteína tau, ficando mais suscetível à hiperfosforilação<sup>120</sup>. Num estudo realizado por Farooqui *et al.*<sup>186</sup>, verificou-se um aumento dos níveis de PS em frações de membrana plasmática isolada de cérebros com doença de Alzheimer comparativamente ao grupo controlo. Estes autores apontam como explicação para este aumento a possível estimulação da síntese de acetilcolina e dopamina no córtex central em resposta ao baixo nível de acetilcolina característico da doença de Alzheimer, diminuindo a memória e atenção de ratinhos transgénicos APP Swedish<sup>187</sup>. Num estudo realizado por Simakova *et al.*<sup>188</sup>, foi estudada a presença de PS em células neuronais e a sua ligação a neurotoxicidade do péptido A $\beta$ . Estes autores demonstraram que a maioria das células que exibem afinidade preferencial para a ligação do péptido A $\beta$ , ativam a passagem da PS para o folheto exterior como molécula sinalizadora de apoptose. Sendo assim, a ligação do péptido de A $\beta$  é maior em células danificadas e com baixos níveis de ATP citosólico. Desta forma, os níveis elevados de PS encontrados no grupo transgénico podem estar associados a estímulos apoptóticos. Existem, no entanto, outros estudos realizados em diferentes modelos de ratinho transgénico<sup>110</sup> e em cérebro de paciente de doença de Alzheimer<sup>184</sup>, em que foi reportado que o conteúdo de PS se encontrava diminuído em relação aos grupos controlo. A razão para esta discrepância é desconhecida.

Na análise da fase orgânica do cérebro de ratinho foi identificado, para além dos fosfolípidos, um grupo de esfingolípidos, os sulfatidos. Como esperado<sup>124</sup>, os sulfatidos que apresentam uma abundância relativa maior são o sulfatido d18:1/20:0, sulfatido

d18:1/20:0(2OH), sulfatido d18:1/22:0(2OH), sulfatido d18:1/24:1(15Z), sulfatido d18:1/24:1(15Z)(2OH), encontrando-se aumentados relativamente ao controlo. Os restantes sulfatidos encontrados, sulfatido d18:1/16:0(2OH), sulfatido d18:1/18:0, sulfatido d18:1/18:0(2OH), sulfatido d18:1/20:0, sulfatido d18:1/20:0(2OH), embora significativamente aumentados em relação ao controlo, apresentam abundâncias relativas inferiores. O teor de sulfatidos encontra-se aumentado no modelo de ratinho 3xtg-AD. Recorrendo à literatura é possível verificar que os níveis de sulfatidos e a doença de Alzheimer estão intimamente ligados<sup>131,128</sup>. Em ratinhos deficientes em ApoE, os níveis de sulfatidos aparecem aumentados, comparativamente a ratinhos *wild-type*<sup>131</sup>. Um estudo realizado em ratinhos transgénicos APP/PSEN1 com 3, 6, 9 e 14 meses apresenta um aumento dos níveis de sulfatidos, relacionados com a idade<sup>189</sup>. No entanto, Yuki *et al.*<sup>128</sup> reportam que os níveis de sulfatidos são similares aos níveis medidos no grupo controlo, em cérebros de pacientes com doença de Alzheimer. Outro estudo realizado por Majocha *et al.*<sup>190</sup>, em cérebro de pacientes com doença de Alzheimer, mostra um aumento dos níveis de sulfatidos. Han *et al.*<sup>129</sup> realizaram um estudo em cérebro de pacientes doentes, onde os níveis de sulfatidos detetados se encontravam diminuídos, sugerindo a sua relação com a disfunção neuronal e a patogénese da doença de Alzheimer. Diferentes autores sugerem que a diminuição dos níveis de sulfatidos ocorre em pacientes com demência muito ligeira<sup>129</sup> e em pacientes com NFT pouco severas<sup>191</sup>, sugerindo que esta diminuição ocorre em fases iniciais da patologia. Assim, os níveis de sulfatidos variam de acordo com a fase da doença de Alzheimer, justificando as diferenças encontradas na literatura.

A análise discriminativa (**Figura 26**) demonstra que a doença de Alzheimer induz alterações específicas na abundância relativa de espécies de fosfolípidos em cérebro de ratinho transgénico. Este tipo de análise demonstra que a doença induz uma alteração significativa no lipidoma do cérebro do ratinho. As variáveis que contribuem para discriminar o grupo controlo são a PE 44:10, PC 40:7, PS 40:4 e PS 38:6, espécies com grandes cadeias carbonas e altamente insaturadas. Os fosfolípidos que permitem a maior discriminação entre os grupos são a PI 34:2, PI 40:5 e LPE 20:4, que permitem classificar as amostras do grupo transgénico. Como discutido anteriormente, os fosfolípidos da classe das PI são importantes precursores de mensageiros secundários necessários para o processo de neurotransmissão<sup>105</sup>. A presença desta classe como uma variável importante na separação dos dois grupos de estudo está consistente com os resultados obtidos, uma vez que a sua



diminuição está associada à diminuição da libertação de neurotransmissores e aumento da atividade da  $\gamma$ -secretase, responsável pela clivagem da APP em  $A\beta^{110}$  que, por sua vez, são características associadas à doença de Alzheimer. A espécie LPE 20:4 encontra-se aumentada no grupo de ratinhos transgênicos. A formação desta espécie está associada a atividade do sistema antioxidante e inflamação.



## **Capítulo 5 - Conclusão e trabalhos futuros**



O presente trabalho permitiu a identificação das espécies lipídicas presentes na fase aquosa e fase orgânica obtidos de extração de cérebro de ratinho triplo transgênico para a doença de Alzheimer, recorrendo à cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa. A análise dos perfis de gangliósidos e de fosfolípidos permitiu identificar espécies com abundâncias relativas significativamente diferentes entre os grupos controlo e ratinhos transgênicos para a doença de Alzheimer. A análise discriminante permitiu, em ambos os casos, uma separação entre os grupos, sendo a separação maior utilizando como variável os fosfolípidos. Este resultado permite-nos concluir que a magnitude das alterações nos fosfolípidos é maior do que nos gangliósidos.

A agregação do péptido A $\beta$  estabelece um dos principais papéis na patogénese da doença de Alzheimer. A presença de uma elevada quantidade de A $\beta$ , resultante da mutação no gene APP, origina níveis de GM1 diminuídos no cérebro de ratinhos transgênicos, devido à formação dos complexos neurotóxicos. Por outro lado, consistente com a diminuição da abundância relativa de GM1, há um aumento de diversos gangliósidos complexos que favorecem a formação do complexo GM1-A $\beta$ . Além disso, o aumento de gangliósidos complexos como o GT1b e o GQ1 está associado à indução da conformação em folha- $\beta$  do péptido A $\beta$  e ao declínio da função colinérgica, ambas características associadas à doença de Alzheimer. Assim, alterações nos níveis de gangliósidos estão intimamente relacionadas com a severidade da doença de Alzheimer, particularmente na deposição de A $\beta$  e formação de placas senis. A abordagem do estudo dos fosfolípidos permitiu a identificação de diferentes alterações destes lípidos na doença de Alzheimer. A diminuição dos níveis do fosfolípido da classe PI está ligada ao aumento dos níveis de NFT, causados pela mutação MAPT P301L. Por outro lado, o aumento dos níveis de PS faz com que a proteína tau perca a afinidade à membrana, ficando na forma livre e mais suscetível à hiperfosforilação e, como consequência, à formação de NFT no interior das células neuronais. As alterações nos níveis de fosfolípidos da classe PS e do gangliósido GD3 estão relacionados com a apoptose celular e neurodegeneração, presentes nesta patologia.

Em conclusão, o nosso trabalho permitiu detetar alterações na homeostasia dos lípidos na doença de Alzheimer, enfatizando a sua importância em condições fisiológicas. Este trabalho fornece uma nova visão de como, na sua globalidade, os fosfolípidos e os gangliósidos podem ser utilizados como possíveis marcadores da doença de Alzheimer. Os gangliósidos estão intimamente ligados a alterações na agregação da proteína A $\beta$ , enquanto

que os fosfolípidos estão mais ligados à hiperfosforilação da proteína tau. Ambas as classes lipídicas causam alterações na clivagem da APP. Com base nos resultados obtidos e como perspectiva futura, seria importante estudar o mesmo modelo de ratinho triplo transgénico com diferentes idades, de forma a detetar possíveis alterações no perfil lipídico, permitindo descobrir um marcador para a deteção precoce desta doença. Por outro lado, seria interessante estudar as alterações nestes lípidos no sangue ou plasma de pacientes com doença de Alzheimer, de forma a validar espécies de lípidos como marcadores da condição patológica.

## **Capítulo 6 – Referências**





1. Organização Mundial de Saúde. Dementia - Fact sheet. (2016). em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/en/#>>, visitado a 11 de junho de 2016
2. Anand, R., Gill, K. D. & Mahdi, A. A. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology* **76**, 27–50 (2014).
3. Kivipelto, M., Helkala, E.L., Laakso, M. P., Hänninen, T., Hallikainen, M., Alhainen, K., Soininen, H., Tuomilehto, J. & Nissinen, A. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *Bmj* **322**, 1447–1451 (2001).
4. Ramirez-Bermudez, J. Alzheimer's Disease: Critical Notes on the History of a Medical Concept. *Archives of Medical Research* **43**, 595–599 (2012).
5. Bartus, R. T. On Neurodegenerative Diseases, Models, and Treatment Strategies: Lessons Learned and Lessons Forgotten a Generation Following the Cholinergic Hypothesis. *Experimental Neurology* **163**, 495–529 (2000).
6. Craig, L. A., Hong, N. S. & McDonald, R. J. Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **35**, 1397–1409 (2011).
7. Doody, R. S., Dunn, J. K., Clark, C. M., Farlow, M., Foster, N. L., Liao, T., Gonzales, N., Lai, E. & Massman, P. Chronic Donepezil Treatment Is Associated with Slowed Cognitive Decline in Alzheimer's Disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* **12**, 295–300 (2001).
8. Goate, A., Chartier-Harlin, M.-C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., Mant, R., Newton, P., Rooke, K., Roques, P., Talbot, C., Pericak-Vance, M., Roses, A., Williamson, R., Rossor, M., Owen, M. & Hardy, J. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* **349**, 704–706 (1991).
9. Karran, E., Mercken, M. & Strooper, B. D. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* **10**, 698–712 (2011).
10. Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., Tsuda, T., Mar, L., Foncin, J.-F., Bruni, A. C., Montesi, M. P., Sorbi, S., Rainero, I., Pinessi, L., Nee, L., Chumakov, I., Pollen, D., Brookes, A., Sanseau, P., Polinsky, R. J., Wasco, W., Da Silva, H. A. R., Haines, J. L., Pericak-Vance, M. A., Tanzi, R. E., Roses, A. D., Fraser, P. E., Rommens, J. M. & St. George-Hyslop, P. H. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* **375**, 754–760 (1995).
11. Rogaev, E. I., Sherrington, R., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holman, K., Tsuda, T., Mar, L., Sorbi, S., Nacmias, B., Piacentini, S., Amaducci, L., Chumakov, I., Cohen, D., Lannfelt, L., Fraser, P. E., Rommens, J. M. & George-Hyslop, P. H.

- S. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* **376**, 775–778 (1995).
12. Mohandas, E., Rajmohan, V. & Raghunath, B. Neurobiology of Alzheimer's disease. *Indian Journal of Psychiatry* **51**, 55–61 (2009).
  13. Salomone, S., Caraci, F., Leggio, G. M., Fedotova, J. & Drago, F. New pharmacological strategies for treatment of Alzheimer's disease: focus on disease modifying drugs: Disease-modifying drugs for Alzheimer's disease. *British Journal of Clinical Pharmacology* **73**, 504–517 (2012).
  14. Hardy, J. The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal: Amyloid hypothesis for Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* **110**, 1129–1134 (2009).
  15. Dal Prà, I., Chiarini, A., Gui, L., Chakravarthy, B., Pacchiana, R., Gardenal, E., Whitfield, J. F. & Armato, U. Do astrocytes collaborate with neurons in spreading the 'infectious' A $\beta$  and Tau drivers of Alzheimer's disease? *The Neuroscientist* **21**, 9–29 (2015).
  16. Lansdall, C. J. An effective treatment for Alzheimer's disease must consider both amyloid and tau. *Biosci. Horiz.* **7**, 19524–19529 (2014).
  17. Braak, H. & Braak, E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica* **82**, 239–259 (1991).
  18. Querfurth, H. W. & LaFerla, F. M. Mechanisms of disease: Alzheimer's Disease. *The New England Journal of Medicine* **362**, 329–344 (2010).
  19. Farwanah, H. & Kolter, T. Lipidomics of Glycosphingolipids. *Metabolites* **2**, 134–164 (2012).
  20. Groux-Degroote, S., Guérardel, Y., Julien, S. & Delannoy, P. Gangliosides in breast cancer: New perspectives. *Biochemistry (Moscow)* **80**, 808–819 (2015).
  21. Grimm, M. O. W., Tschäpe, J.-A., Grimm, H. S., Zinser, E. G. & Hartmann, T. Altered membrane fluidity and lipid raft composition in presenilin-deficient cells. *Acta Neurologica Scandinavica* **114**, 27–32 (2006).
  22. Kalanj-Bognar, S. Ganglioside catabolism is altered in fibroblasts and leukocytes from Alzheimer's disease patients. *Neurobiology of Aging* **27**, 1354–1356 (2006).
  23. Han, X. Neurolipidomics: challenges and developments. *Frontiers in Bioscience: A virtual library of medicine* **12**, 2601–2615 (2007).
  24. van Meer, G., Voelker, D. R. & Feigenson, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 112–124 (2008).
  25. Kolter, T. A view on sphingolipids and disease. *Chemistry and Physics of Lipids* **164**, 590–606 (2011).

26. David L Nelson; Albert L Lehninger; Michael M Cox. *Lehninger - Principles of Biochemistry*. (W.H. Freeman and Company).
27. Fonteh, A. N., Ormseth, C., Chiang, J., Cipolla, M., Arakaki, X. & Harrington, M. G. Sphingolipid Metabolism Correlates with Cerebrospinal Fluid Beta Amyloid Levels in Alzheimer's Disease. *PLOS ONE* **10**, 1–22 (2015).
28. Okajima, F. Plasma lipoproteins behave as carriers of extracellular sphingosine 1-phosphate: is this an atherogenic mediator or an anti-atherogenic mediator? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1582**, 132–137 (2002).
29. Kim, Y. M., Park, T.-S. & Kim, S. G. The role of sphingolipids in drug metabolism and transport. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **9**, 319–331 (2013).
30. Fahy, E. A comprehensive classification system for lipids. *The Journal of Lipid Research* **46**, 839–862 (2005).
31. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. The nomenclature of lipids. (Recommendations 1976). *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **171**, 21–35 (1978).
32. Birkle, S., Zeng, G., Gao, L., Yu, R. K. & Aubry, J. Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. *Biochimie* **85**, 455–463 (2003).
33. Prokazova, N. V. & Bergelson, L. D. Gangliosides and atherosclerosis. *Lipids* **29**, 1–5 (1994).
34. Ariga, T., Yanagisawa, M., Wakade, C., Ando, S., Buccafusco, J. J., McDonald, M. P. & Yu, R. K. Ganglioside metabolism in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: expression of Chol-1 $\alpha$  antigens in the brain. *ASN Neuro* **2**, 233–241 (2010).
35. Lavery, S. B. Glycosphingolipid structural analysis and glycosphingolipidomics. *Methods in Enzymology* **405**, 300–369 (2005).
36. Kolter, T. Ganglioside Biochemistry. *ISRN Biochemistry* **2012**, 1–36 (2012).
37. Feizi, T. Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens. *Nature* **314**, 53–57 (1985).
38. Yu, R. K., Yanagisawa, M. & Ariga, T. Glycosphingolipid Structures. **1**, 73–122 (2007).
39. Sonnino, S. & Chigorno, V. Ganglioside molecular species containing C18-and C20-sphingosine in mammalian nervous tissues and neuronal cell cultures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes* **1469**, 63–77 (2000).
40. Furukawa, K., Ohmi, Y., Ohkawa, Y., Tokuda, N., Kondo, Y., Tajima, O. & Furukawa, K. Regulatory Mechanisms of Nervous Systems with Glycosphingolipids. *Neurochemical Research* **36**, 1578–1586 (2011).

41. Baumann, N. & Pham-Dinh, D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiological reviews* **81**, 871–927 (2001).
42. Tyurin, V. A., Tyurina YYu, & Avrova, N. F. Ganglioside-dependent factor, inhibiting lipid peroxidation in rat brain synaptosomes. *Neurochem. International* **20**, 401–407 (1992).
43. Wang, B. Sialic Acid Is an Essential Nutrient for Brain Development and Cognition. *Annual Review of Nutrition* **29**, 177–222 (2009).
44. Schwarz, A. & Futerman, A. H. The localization of gangliosides in neurons of the central nervous system: the use of anti-ganglioside antibodies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes* **1286**, 247–267 (1996).
45. Yu, R. K., Nakatani, Y. & Yanagisawa, M. The role of glycosphingolipid metabolism in the developing brain. *The Journal of Lipid Research* **50**, 440–445 (2008).
46. Hirschberg, K., Zisling, R., van Echten-Deckert, G. & Futerman, A. H. Ganglioside Synthesis during the Development of Neuronal Polarity. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 14876–14882 (1996).
47. Ledeen, R. W. & Wu, G. Thematic Review Series: Sphingolipids. Nuclear sphingolipids: metabolism and signaling. *The Journal of Lipid Research* **49**, 1176–1186 (2008).
48. Garofalo, T., Tinari, A., Matarrese, P., Giammarioli, A. M., Manganelli, V., Ciarlo, L., Misasi, R., Sorice, M. & Malorni, W. Do mitochondria act as ‘cargo boats’ in the journey of GD3 to the nucleus during apoptosis? *FEBS Letters* **581**, 3899–3903 (2007).
49. Yu, R. K., Usuki, S. & Ariga, T. Ganglioside Molecular Mimicry and Its Pathological Roles in Guillain-Barre Syndrome and Related Diseases. *Infection and Immunity* **74**, 6517–6527 (2006).
50. Svennerholm, L. Chromatographic separation of human brain gangliosides. *Journal of Neurochemistry* **10**, 613–623 (1963).
51. Chester, M. A. Nomenclature of glycolipids (recommendations 1997) IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). *European Journal of Biochemistry* **257**, 293–298 (1998).
52. Yamashita, T., Wada, R., Sasaki, T., Deng, C., Bierfreund, U., Sandhoff, K. & Proia, R. L. A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **96**, 9142–9147 (1999).
53. Maccioni, H. J. Glycosylation of glycolipids in the Golgi complex. *Journal of Neurochemistry* **103**, 81–90 (2007).
54. Giraudo, C. G. & Maccioni, H. J. F. Ganglioside glycosyltransferases organize in distinct multienzyme complexes in CHO-K1 cells. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 40262–40271 (2003).

55. Kolter, T., Proia, R. L. & Sandhoff, K. Combinatorial Ganglioside Biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 25859–25862 (2002).
56. Suzuki, Y. Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **28**, 399–408 (2005).
57. Sandhoff, K. & Harzer, K. Gangliosides and Gangliosidoses: Principles of Molecular and Metabolic Pathogenesis. *Journal of Neuroscience* **33**, 10195–10208 (2013).
58. Inokuchi, J. Membrane microdomains and insulin resistance. *FEBS Letters* **584**, 1864–1871 (2010).
59. Bernardo, A., Harrison, F. E., McCord, M., Zhao, J., Bruchey, A., Davies, S. S., Jackson Roberts, L., Mathews, P. M., Matsuoka, Y., Ariga, T., Yu, R. K., Thompson, R. & McDonald, M. P. Elimination of GD3 synthase improves memory and reduces amyloid- $\beta$  plaque load in transgenic mice. *Neurobiology of Aging* **30**, 1777–1791 (2009).
60. Matsuzaki, K., Kato, K. & Yanagisawa, K. A $\beta$  polymerization through interaction with membrane gangliosides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1801**, 868–877 (2010).
61. Hirabayashi, Y., Nakao, T., Irie, F., Whittaker, V. P., Kon, K. & Ando, S. Structural characterization of a novel cholinergic neuron-specific ganglioside in bovine brain. *The Journal of Biological Chemistry* **267**, 12973–12978 (1992).
62. Ando, S., Hirabayashi, Y., Kon, K., Inagaki, F., Tate, S. & Whittaker, V. P. A trisialoganglioside containing a sialyl  $\alpha$  2-6 N-acetylgalactosamine residue is a cholinergic-specific antigen, Chol-1  $\alpha$ . *Journal of Biochemistry* **111**, 287–290 (1992).
63. Svennerholm, L., Bråne, G., Karlsson, I., Lekman, A., Ramström, I. & Wikkelsö, C. Alzheimer disease - effect of continuous intracerebroventricular treatment with GM1 ganglioside and a systematic activation programme. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* **14**, 128–136 (2002).
64. Ariga, T., Kobayashi, K., Hasegawa, A., Kiso, M., Ishida, H. & Miyatake, T. Characterization of High-Affinity Binding between Gangliosides and Amyloid  $\beta$ -Protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **388**, 225–230 (2001).
65. Morgado, I. & Garvey, M. Lipids in Amyloid- $\beta$  Processing, Aggregation, and Toxicity. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **855**, 67–94 (2015).
66. Avrova, N. F., Victorov, I. V., Tyurin, V. A., Zakharova, I. O., Sokolova, T. V., Andreeva, N. A., Stelmaschuk, E. V., Tyurina, Y. Y. & Gonchar, V. S. Inhibition of glutamate-induced intensification of free radical reactions by gangliosides: possible role in their protective effect in rat cerebellar granule cells and brain synaptosomes. *Neurochemical Research* **23**, 945–952 (1998).

67. Sokolova, T. V., Furaev, V. V., Victorov, I. V., Andreeva, N. A. & Avrova, N. F. Stimulation by gangliosides of viability of rat brain neurons and of neuronal PC12 cell line under conditions of oxidative stress. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* **41**, 415–423 (2005).
68. Hong, S., Ostaszewski, B. L., Yang, T., O'Malley, T. T., Jin, M., Yanagisawa, K., Li, S., Bartels, T. & Selkoe, D. J. Soluble A $\beta$  Oligomers Are Rapidly Sequestered from Brain ISF In Vivo and Bind GM1 Ganglioside on Cellular Membranes. *Neuron* **82**, 308–319 (2014).
69. Zha, Q., Ruan, Y., Hartmann, T., Beyreuther, K. & Zhang, D. GM1 ganglioside regulates the proteolysis of amyloid precursor protein. *Molecular Psychiatry* **9**, 946–952 (2004).
70. Molander-Melin, M., Blennow, K., Bogdanovic, N., Dellheden, B., Mansson, J.-E. & Fredman, P. Structural membrane alterations in Alzheimer brains found to be associated with regional disease development; increased density of gangliosides GM1 and GM2 and loss of cholesterol in detergent-resistant membrane domains. *Journal of Neurochemistry* **92**, 171–182 (2005).
71. Pernber, Z., Blennow, K., Bogdanovic, N., Mansson, J.-E. & Blomqvist, M. Altered distribution of the gangliosides GM1 and GM2 in Alzheimer's disease. *Dementia and geriatric cognitive disorders* **33**, 174–188 (2012).
72. Copani, A., Melchiorri, D., Caricasole, A., Martini, F., Sale, P., Carnevale, R., Gradini, R., Sortino, M. A., Lenti, L., De Maria, R. & others.  $\beta$ -Amyloid-induced synthesis of the ganglioside GD3 is a requisite for cell cycle reactivation and apoptosis in neurons. *The Journal of neuroscience* **22**, 3963–3968 (2002).
73. Grimm, M. O. W., Zinser, E. G., Grösgen, S., Hundsörfer, B., Rothhaar, T. L., Burg, V. K., Kaestner, L., Bayer, T. A., Lipp, P., Müller, U., Grimm, H. S. & Hartmann, T. Amyloid Precursor Protein (APP) Mediated Regulation of Ganglioside Homeostasis Linking Alzheimer's Disease Pathology with Ganglioside Metabolism. *PLOS ONE* **7**, 1-12 (2012).
74. Posse de Chaves, E. & Sipione, S. Sphingolipids and gangliosides of the nervous system in membrane function and dysfunction. *FEBS Letters* **584**, 1748–1759 (2010).
75. Schnaar, R. L. Brain gangliosides in axon–myelin stability and axon regeneration. *FEBS Letters* **584**, 1741–1747 (2010).
76. Ando, S. Neuronal dysfunction with aging and its amelioration. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* **88**, 266–282 (2012).
77. Ariga, T., McDonald, M. P. & Yu, R. K. Role of ganglioside metabolism in the pathogenesis of Alzheimer's disease--a review. *The Journal of Lipid Research* **49**, 1157–1175 (2008).
78. Mlinac, K., Fabris, D., Vukelić, Ž., Rožman, M., Heffer, M. & Bognar, S. K. Structural analysis of brain ganglioside acetylation patterns in mice with altered ganglioside biosynthesis. *Carbohydrate Research* **382**, 1–8 (2013).
79. Mandal, C., Schwartz-Albiez, R. & Vlasak, R. Functions and Biosynthesis of O-Acetylated Sialic Acids. *Topics in Current Chemistry* **366**, 1–30 (2012).

80. Schnaar, R. L., Gerardy-Schahn, R. & Hildebrandt, H. Sialic Acids in the Brain: Gangliosides and Polysialic Acid in Nervous System Development, Stability, Disease, and Regeneration. *Physiological Reviews* **94**, 461–518 (2014).
81. McLaurin, J. & Chakrabartty, A. Membrane disruption by Alzheimer beta-amyloid peptides mediated through specific binding to either phospholipids or gangliosides. Implications for neurotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 26482–26489 (1996).
82. Patel, D., Henry, J. & Good, T. Attenuation of  $\beta$ -amyloid induced toxicity by sialic acid-conjugated dendrimeric polymers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1760**, 1802–1809 (2006).
83. Wang, S. S.-S. Reduction in Cholesterol and Sialic Acid Content Protects Cells from the Toxic Effects of beta -Amyloid Peptides. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 42027–42034 (2001).
84. Castro-Gómez, P., Garcia-Serrano, A., Visioli, F. & Fontecha, J. Relevance of dietary glycerophospholipids and sphingolipids to human health. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)* **101**, 41–51 (2015).
85. Guo, Z., Vikbjerg, A. F. & Xu, X. Enzymatic modification of phospholipids for functional applications and human nutrition. *Biotechnology Advances* **23**, 203–259 (2005).
86. Vance, J. E. & Tasseva, G. Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1831**, 543–554 (2013).
87. Pulfer, M. & Murphy, R. C. Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrometry Reviews* **22**, 332–364 (2003).
88. El-Desouki, R. A. K. M. New insights on Alzheimer's disease. *Journal of Microscopy and Ultrastructure* **2**, 57–66 (2014).
89. Grziwa, B. The Transmembrane Domain of the Amyloid Precursor Protein in Microsomal Membranes Is on Both Sides Shorter than Predicted. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 6803–6808 (2003).
90. Kalvodova, L. Lipids as Modulators of Proteolytic Activity of BACE: involvement of cholesterol, glycosphingolipids, and anionic phospholipids in vitro. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 36815–36823 (2005).
91. O'Brien, J. S. & Sampson, E. L. Lipid composition of the normal human brain: gray matter, white matter, and myelin. *The Journal of Lipid Research* **6**, 537–544 (1965).
92. Cui, Z. & Houweling, M. Phosphatidylcholine and cell death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* **1585**, 87–96 (2002).
93. Mikawa, S., Suzuki, M., Fujimoto, C. & Sato, K. Imaging of phosphatidylcholines in the adult rat brain using MALDI-TOF MS. *Neuroscience Letters* **451**, 45–49 (2009).

94. Farooqui, A. A., Horrocks, L. A. & Farooqui, T. Modulation of inflammation in brain: a matter of fat. *Journal of Neurochemistry* **101**, 577–599 (2006).
95. Steinbrecher, U., Parthasarathy, S., Leake, D. S., Witztum, J. L. & Steinberg, D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **81**, 3883–3887 (1984).
96. Ousman, S. S. & David, S. Lysophosphatidylcholine induces rapid recruitment and activation of macrophages in the adult mouse spinal cord. *Glia* **30**, 92–104 (2000).
97. Schaeffer, E. L., Forlenza, O. V. & Gattaz, W. F. Phospholipase A2 activation as a therapeutic approach for cognitive enhancement in early-stage Alzheimer disease. *Psychopharmacology* **202**, 37–51 (2009).
98. Sheikh, A. M., Nagai, A., Ryu, J. K., McLarnon, J. G., Kim, S. U. & Masuda, J. Lysophosphatidylcholine induces glial cell activation: Role of rho kinase. *Glia* **57**, 898–907 (2009).
99. Martens, S. & McMahon, H. T. Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 543–556 (2008).
100. Prasad, M. R., Lovell, M. A., Yatin, M., Dhillon, H. & Markesbery, W. R. Regional membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease. *Neurochemical research* **23**, 81–88 (1998).
101. Montine, T. J., Neely, M. D., Quinn, J. F., Beal, M. F., Markesbery, W. R., Roberts, L. J. & Morrow, J. D. Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease 1, 2. *Free Radical Biology and Medicine* **33**, 620–626 (2002).
102. Wood, P. L., Phillipps, A., Woltjer, R. L., Kaye, J. A. & Quinn, J. F. Increased Lysophosphatidylethanolamine and Diacylglycerol levels in Alzheimer's Disease Plasma. *JSM Alzheimer's Dis Related Dementia I* **1**, 1001–1005 (2014).
103. Brosche, T. & Platt, D. The biological significance of plasmalogens in defense against oxidative damage. *Experimental gerontology* **33**, 363–369 (1998).
104. Han, X., Holtzman, D. M. & McKeel, D. W. Plasmalogen deficiency in early Alzheimer's disease subjects and in animal models: molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Neurochemistry* **77**, 1168–1180 (2001).
105. Bennett, S. A. L., Valenzuela, N., Xu, H., Franko, B., Fai, S. & Figeys, D. Using neurolipidomics to identify phospholipid mediators of synaptic (dys)function in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Physiology* **4**, 1-16 (2013).
106. Morita, S. & Terada, T. Enzymatic measurement of phosphatidylglycerol and cardiolipin in cultured cells and mitochondria. *Scientific Reports* **5**, 11737 (2015).



107. Murray, N. R. Phosphatidylglycerol Is a Physiologic Activator of Nuclear Protein Kinase C. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 11514–11520 (1998).
108. Terzi, E., Hölzemann, G. & Seelig, J. Self-association of  $\beta$ -Amyloid Peptide (1–40) in Solution and Binding to Lipid Membranes. *Journal of Molecular Biology* **252**, 633–642 (1995).
109. Stokes, C. E. & Hawthorne, J. N. Reduced phosphoinositide concentrations in anterior temporal cortex of Alzheimer-diseased brains. *Journal of Neurochemistry* **48**, 1018–1021 (1987).
110. Chan, R. B., Oliveira, T. G., Cortes, E. P., Honig, L. S., Duff, K. E., Small, S. A., Wenk, M. R., Shui, G. & Di Paolo, G. Comparative Lipidomic Analysis of Mouse and Human Brain with Alzheimer Disease. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 2678–2688 (2012).
111. Landman, N., Jeong, S. Y., Shin, S. Y., Voronov, S. V., Serban, G., Kang, M. S., Park, M. K., Di Paolo, G., Chung, S. & Kim, T.-W. Presenilin mutations linked to familial Alzheimer's disease cause an imbalance in phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 19524–19529 (2006).
112. Svennerholm, L. Distribution and fatty acid composition of phosphoglycerides in normal human brain. *The Journal of Lipid Research* **9**, 570–579 (1968).
113. Glade, M. J. & Smith, K. Phosphatidylserine and the human brain. *Nutrition* **31**, 781–786 (2015).
114. Leventis, P. A. & Grinstein, S. The Distribution and Function of Phosphatidylserine in Cellular Membranes. *Annual Review of Biophysics* **39**, 407–427 (2010).
115. Kimura, A. K. & Kim, H.-Y. Phosphatidylserine synthase 2: high efficiency for synthesizing phosphatidylserine containing docosahexaenoic acid. *The Journal of Lipid Research* **54**, 214–222 (2013).
116. Cunnane, S. C., Schneider, J. A., Tangney, C., Tremblay-Mercier, J., Fortier, M., Bennett, D. A. & Morris, M. C. Plasma and brain fatty acid profiles in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* **29**, 691–697 (2012).
117. Marra, C., Silveri, M. C. & Gainotti, G. Predictors of cognitive decline in the early stage of probable Alzheimer's disease. *Dementia and geriatric cognitive disorders* **11**, 212–218 (2000).
118. Bader Lange, M. L., Cenini, G., Piroddi, M., Mohammad Abdul, H., Sultana, R., Galli, F., Memo, M. & Butterfield, D. A. Loss of phospholipid asymmetry and elevated brain apoptotic protein levels in subjects with amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Neurobiology of Disease* **29**, 456–464 (2008).
119. Bader Lange, M. L., St. Clair, D., Markesbery, W. R., Studzinski, C. M., Murphy, M. P. & Butterfield, D. A. Age-related loss of phospholipid asymmetry in APPNLh/APPNLh x PS-

- 1P264L/PS-1P264L human double mutant knock-in mice: Relevance to Alzheimer disease. *Neurobiology of Disease* **38**, 104–115 (2010).
120. Shea, T. B. Phospholipids alter tau conformation, phosphorylation, proteolysis, and association with microtubules: implication for tau function under normal and degenerative conditions. *Journal of neuroscience research* **50**, 114–122 (1997).
  121. Crook, T., Petrie, W., Wells, C. & Massari, D. C. Effects of phosphatidylserine in Alzheimer's disease. *Psychopharmacol Bull* **28**, 61–66 (1992).
  122. Kato-Kataoka, A., Sakai, M., Ebina, R., Nonaka, C., Asano, T. & Miyamori, T. Soybean-Derived Phosphatidylserine Improves Memory Function of the Elderly Japanese Subjects with Memory Complaints. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* **47**, 246–255 (2010).
  123. Eckhardt, M. The Role and Metabolism of Sulfatide in the Nervous System. *Molecular Neurobiology* **37**, 93–103 (2008).
  124. Takahashi, T. & Suzuki, T. Role of sulfatide in normal and pathological cells and tissues. *The Journal of Lipid Research* **53**, 1437–1450 (2012).
  125. Ishizuka, I. Chemistry and functional distribution of sulfoglycolipids. *Progress in Lipid Research* **36**, 245–319 (1997).
  126. Hirahara, Y., Bansal, R., Honke, K., Ikenaka, K. & Wada, Y. Sulfatide is a negative regulator of oligodendrocyte differentiation: Development in sulfatide-null mice. *Glia* **45**, 269–277 (2004).
  127. Shroff, S. M., Pomicter, A. D., Chow, W. N., Fox, M. A., Colello, R. J., Henderson, S. C. & Dupree, J. L. Adult CST-null mice maintain an increased number of oligodendrocytes. *Journal of Neuroscience Research* **87**, 3403–3414 (2009).
  128. Yuki, D., Sugiura, Y., Zaima, N., Akatsu, H., Hashizume, Y., Yamamoto, T., Fujiwara, M., Sugiyama, K. & Setou, M. Hydroxylated and non-hydroxylated sulfatide are distinctly distributed in the human cerebral cortex. *Neuroscience* **193**, 44–53 (2011).
  129. Han, X., M Holtzman, D., W McKeel, D., Kelley, J. & Morris, J. C. Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer's disease: potential role in disease pathogenesis. *Journal of neurochemistry* **82**, 809–818 (2002).
  130. Gottfries, C. G., Karlsson, I. & Svennerholm, L. Membrane components separate early-onset Alzheimer's disease from senile dementia of the Alzheimer type. *International Psychogeriatrics* **8**, 365–372 (1996).
  131. Han, X. Novel Role for Apolipoprotein E in the Central Nervous System. Modulation of sulfatide content. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 8043–8051 (2003).

132. Haynes, C. A., Allegood, J. C., Park, H. & Sullards, M. C. Sphingolipidomics: Methods for the comprehensive analysis of sphingolipids. *Journal of Chromatography B* **877**, 2696–2708 (2009).
133. Sisu, E., Flangea, C., Serb, A., Rizzi, A. & Zamfir, A. D. High-performance separation techniques hyphenated to mass spectrometry for ganglioside analysis. *Electrophoresis* **32**, 1591–1609 (2011).
134. Svennerholm, L. & Fredman, P. A procedure for the quantitative isolation of brain gangliosides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **617**, 97–109 (1980).
135. Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. **226**, 497–509 (1957).
136. Ikeda, K., Shimizu, T. & Taguchi, R. Targeted analysis of ganglioside and sulfatide molecular species by LC/ESI-MS/MS with theoretically expanded multiple reaction monitoring. *The Journal of Lipid Research* **49**, 2678–2689 (2008).
137. Sorensen, L. K. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric approach for the determination of gangliosides GD3 and GM3 in bovine milk and infant formulae. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **20**, 3625–3633 (2006).
138. Kirsch, S. Ceramide Profiles of Human Serum Gangliosides GM2 and GD1a exhibit Cancer-associated Alterations. *Journal of Glycomics & Lipidomics* **1**, 1–10 (2012).
139. Bligh, E. G. & Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **37**, 911–917 (1959).
140. Zhao, Z. & Xu, Y. An extremely simple method for extraction of lysophospholipids and phospholipids from blood samples. *The Journal of Lipid Research* **51**, 652–659 (2010).
141. Giuffrida, F., Elmelegy, I. M., Thakkar, S. K., Marmet, C. & Destailats, F. Longitudinal Evolution of the Concentration of Gangliosides GM3 and GD3 in Human Milk. *Lipids* **49**, 997–1004 (2014).
142. Masson, E. A. Y., Sibille, E., Martine, L., Chaux-Picquet, F., Bretillon, L. & Berdeaux, O. Apprehending ganglioside diversity: a comprehensive methodological approach. *Journal of Lipid Research* **56**, 1821–1835 (2015).
143. Czaplicki, D., Horwacik, I., Kowalczyk, A., Wieczorek, A., Bolek-Marzec, K., Balwierz, W., Kozik, A. & Rokita, H. New method for quantitative analysis of GD2 ganglioside in plasma of neuroblastoma patients. *Acta Biochimica Polonica* **56**, 423–431 (2009).
144. Fong, B., Norris, C., Lowe, E. & McJarrow, P. Liquid Chromatography–High-Resolution Mass Spectrometry for Quantitative Analysis of Gangliosides. *Lipids* **44**, 867–874 (2009).

145. Marquina, G., Waki, H., Fernandez, L. E., Kon, K., Carr, A., Valiente, O., Perez, R. & Ando, S. Gangliosides expressed in human breast cancer. *Cancer Research* **56**, 5165–5171 (1996).
146. Popa, I., Pons, A., Mariller, C., Tai, T., Zanetta, J.-P., Thomas, L. & Portoukalian, J. Purification and structural characterization of de-N-acetylated form of GD3 ganglioside present in human melanoma tumors. *Glycobiology* **17**, 367–373 (2007).
147. Hejazi, L., Hibbert, D. B. & Ebrahimi, D. Identification of the geometrical isomers of  $\alpha$ -linolenic acid using gas chromatography/mass spectrometry with a binary decision tree. *Talanta* **83**, 1233–1238 (2011).
148. Hyötyläinen, T. & Orešič, M. Systems biology strategies to study lipidomes in health and disease. *Progress in Lipid Research* **55**, 43–60 (2014).
149. Lam, S. M. & Shui, G. Lipidomics as a Principal Tool for Advancing Biomedical Research. *Journal of Genetics and Genomics* **40**, 375–390 (2013).
150. Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y. & LaFerla, F. M. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A $\beta$  and synaptic dysfunction. *Neuron* **39**, 409–421 (2003).
151. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. & Klenk, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **150**, 76–85 (1985).
152. Bian, L., Yang, J. & Sun, Y. Isolation and purification of monosialotetrahexosylgangliosides from pig brain by extraction and liquid chromatography: Isolation and purification of GM1. *Biomedical Chromatography* **29**, 1604–1611 (2015).
153. Fuller, M., Duplock, S., Hein, L. K., Rigat, B. A. & Mahuran, D. J. Liquid chromatography/electrospray ionisation–tandem mass spectrometry quantification of GM2 gangliosides in human peripheral cells and plasma. *Analytical Biochemistry* **458**, 20–26 (2014).
154. Bartlett, E. M. & Lewis, D. H. Spectrophotometric determination of phosphate esters in the presence and absence of orthophosphate. *Analytical Biochemistry* **36**, 159–167 (1970).
155. Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A. & Orešič, M. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* **11**, 395 (2010).
156. Ito, E., Tominaga, A., Waki, H., Miseki, K., Tomioka, A., Nakajima, K., Kakehi, K., Suzuki, M., Taniguchi, N. & Suzuki, A. Structural Characterization of Monosialo-, Disialo- and Trisialo-gangliosides by Negative Ion AP-MALDI-QIT-TOF Mass Spectrometry with MSn Switching. *Neurochemical Research* **37**, 1315–1324 (2012).

157. Sarbu, M., Robu, A. C., Ghiulai, R. M., Vukelić, Ž., Clemmer, D. E. & Zamfir, A. D. Electrospray Ionization Ion Mobility Mass Spectrometry of Human Brain Gangliosides. *Analytical Chemistry* **88**, 5166–5178 (2016).
158. O'Brien, J. P. & Brodbelt, J. S. Structural Characterization of Gangliosides and Glycolipids via Ultraviolet Photodissociation Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **85**, 10399–10407 (2013).
159. Wood, P. L. Lipidomics of Alzheimer's disease: current status. *Alzheimer's research & therapy* **4**, 1-10 (2012).
160. Ginsberg, L., Rafique, S., Xuereb, J. H., Rapoport, S. I. & Gershfeld, N. L. Disease and anatomic specificity of ethanolamine plasmalogen deficiency in Alzheimer's disease brain. *Brain Research* **698**, 223–226 (1995).
161. Naudí, A., Cabré, R., Jové, M., Ayala, V., Gonzalo, H., Portero-Otín, M., Ferrer, I. & Pamplona, R. in *International Review of Neurobiology* **122**, 133–189 (2015).
162. Han, X. Shotgun lipidomics of phosphoethanolamine-containing lipids in biological samples after one-step in situ derivatization. *The Journal of Lipid Research* **46**, 1548–1560 (2005).
163. Han, X. & Gross, R. W. Shotgun lipidomics: electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples. *Mass Spectrometry Reviews* **24**, 367–412 (2005).
164. Finder, V. H. Alzheimer's disease: a general introduction and pathomechanism. *Journal of Alzheimer's disease* **22**, 5–19 (2010).
165. Haass, C., Lemere, C. A., Capell, A., Citron, M., Seubert, P., Schenk, D., Lannfelt, L. & Selkoe, D. J. The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by  $\beta$ -secretase cleavage within the secretory pathway. *Nature Medicine* **1**, 1291–1296 (1995).
166. Barghorn, S., Zheng-Fischhöfer, Q., Ackmann, M., Biernat, J., von Bergen, M., Mandelkow, E. M. & Mandelkow, E. Structure, microtubule interactions, and paired helical filament aggregation by tau mutants of frontotemporal dementias. *Biochemistry* **39**, 11714–11721 (2000).
167. von Bergen, M., Barghorn, S., Li, L., Marx, A., Biernat, J., Mandelkow, E. M. & Mandelkow, E. Mutations of tau protein in frontotemporal dementia promote aggregation of paired helical filaments by enhancing local beta-structure. *The Journal of Biological Chemistry*. **276**, 48165–48174 (2001).
168. Li, N., Liu, K., Qiu, Y., Ren, Z., Dai, R., Deng, Y. & Qing, H. Effect of Presenilin Mutations on APP Cleavage; Insights into the Pathogenesis of FAD. *Frontiers in Aging Neuroscience* **8**, (2016).

169. Ryazantseva, M., Skobeleva, K. & Kaznacheyeva, E. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin-1 mutation M146V affects store-operated calcium entry: Does gain look like loss? *Biochimie* **95**, 1506–1509 (2013).
170. Barrier, L., Ingrand, S., Damjanac, M., Rioux Bilan, A., Hugon, J. & Page, G. Genotype-related changes of ganglioside composition in brain regions of transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* **28**, 1863–1872 (2007).
171. Koo, E. H. & Kopan, R. Potential role of presenilin-regulated signaling pathways in sporadic neurodegeneration. *Nature Medicine* **10**, S26–S33 (2004).
172. Kracun, I., Kalanj, S., Talan-Hranilovic, J. & Cosovic, C. Cortical distribution of gangliosides in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International* **20**, 433–438 (1992).
173. Mandal, P. K. & Pettegrew, J. W. Alzheimer's disease: NMR studies of asialo (GM1) and trisialo (GT1b) ganglioside interactions with A $\beta$  (1-40) peptide in a membrane mimic environment. *Neurochemical research* **29**, 447–453 (2004).
174. Igarashi, M., Waki, H., Saito, S., Komiya, Y. & Ando, S. Characteristics of gangliosides including O-acetylated species in growth cone membranes at several developmental stages in rat forebrain. *Brain research. Developmental Brain Research*. **78**, 17–24 (1994).
175. Ghidoni, R., Sonnino, S., Tettamanti, G., Baumann, N., Reuter, G. & Schauer, R. Isolation and characterization of a trisialoganglioside from mouse brain, containing 9-O-acetyl-N-acetylneuraminic acid. *The Journal of Biological Chemistry*. **255**, 6990–6995 (1980).
176. Sun, G. Y., He, Y., Chuang, D. Y., Lee, J. C., Gu, Z., Simonyi, A. & Sun, A. Y. Integrating Cytosolic Phospholipase A2 with Oxidative/Nitrosative Signaling Pathways in Neurons: A Novel Therapeutic Strategy for AD. *Molecular Neurobiology* **46**, 85–95 (2012).
177. Sheikh, A. M., Michikawa, M., Kim, S. U. & Nagai, A. Lysophosphatidylcholine increases the neurotoxicity of Alzheimer's amyloid  $\beta$ 1-42 peptide: Role of oligomer formation. *Neuroscience* **292**, 159–169 (2015).
178. Söderberg, M., Edlund, C., Kristensson, K. & Dallner, G. Fatty acid composition of brain phospholipids in aging and in Alzheimer's disease. *Lipids* **26**, 421–425 (1991).
179. Tully, A. M., Roche, H. M., Doyle, R., Fallon, C., Bruce, I., Lawlor, B., Coakley, D. & Gibney, M. J. Low serum cholesteryl ester-docosahexaenoic acid levels in Alzheimer's disease: a case–control study. *British Journal of Nutrition* **89**, 483–489 (2003).
180. Oksman, M., Iivonen, H., Högges, E., Amtul, Z., Penke, B., Leenders, I., Broersen, L., Lütjohann, D., Hartmann, T. & Tanila, H. Impact of different saturated fatty acid, polyunsaturated fatty acid and cholesterol containing diets on beta-amyloid accumulation in APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiology of Disease* **23**, 563–572 (2006).

181. Morel, E., Chamoun, Z., Lasiecka, Z. M., Chan, R. B., Williamson, R. L., Vetanovetz, C., Dall'Armi, C., Simoes, S., Point Du Jour, K. S., McCabe, B. D., Small, S. A. & Di Paolo, G. Phosphatidylinositol-3-phosphate regulates sorting and processing of amyloid precursor protein through the endosomal system. *Nature Communications* **4**, 1-13 (2013).
182. Perry, G., Cash, A. D. & Smith, M. A. Alzheimer disease and oxidative stress. *BioMed Research International* **2**, 120–123 (2002).
183. Yu, X., Wang, Q., Pan, Q., Zhou, F. & Zheng, J. Molecular interactions of Alzheimer amyloid- $\beta$  oligomers with neutral and negatively charged lipid bilayers. *Physical Chemistry Chemical Physics* **15**, 8878 (2013).
184. Pettegrew, J. W., Panchalingam, K., Hamilton, R. L. & McClure, R. J. Brain membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease. *Neurochemical research* **26**, 771–782 (2001).
185. Igbavboa, U., Hamilton, J., Kim, H.-Y., Sun, G. Y. & Wood, W. G. A new role for apolipoprotein E: modulating transport of polyunsaturated phospholipid molecular species in synaptic plasma membranes. *Journal of neurochemistry* **80**, 255–261 (2002).
186. Farooqui, A. A., Rapoport, S. I. & Horrocks, L. A. Membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease: deficiency of ethanolamine plasmalogens. *Neurochemical research* **22**, 523–527 (1997).
187. Watanabe, T., Yamagata, N., Takasaki, K., Sano, K., Hayakawa, K., Katsurabayashi, S., Egashira, N., Mishima, K., Iwasaki, K. & Fujiwara, M. Decreased acetylcholine release is correlated to memory impairment in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Research* **1249**, 222–228 (2009).
188. Simakova, O. & Arispe, N. J. The Cell-Selective Neurotoxicity of the Alzheimer's A Peptide Is Determined by Surface Phosphatidylserine and Cytosolic ATP Levels. Membrane Binding Is Required for A Toxicity. *Journal of Neuroscience* **27**, 13719–13729 (2007).
189. Fabelo, N., Martín, V., Marín, R., Santpere, G., Aso, E., Ferrer, I. & Díaz, M. Evidence for Premature Lipid Raft Aging in APP/PS1 Double-Transgenic Mice, a Model of Familial Alzheimer Disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **71**, 868–881 (2012).
190. Majocha, R. E., Jungalwala, F. B., Rodenrys, A. & Marotta, C. A. Monoclonal antibody to embryonic CNS antigen A2B5 provides evidence for the involvement of membrane components at sites of Alzheimer degeneration and detects sulfatides as well as gangliosides. *Journal of neurochemistry* **53**, 953–961 (1989).
191. Cheng, H., Wang, M., Li, J.-L., Cairns, N. J. & Han, X. Specific changes of sulfatide levels in individuals with pre-clinical Alzheimer's disease: an early event in disease pathogenesis. *Journal of Neurochemistry* **127**, 733–738 (2013).